



# Thèse de doctorat de l'Université de Franche-Comté

**Ecole Doctorale Environnement-Santé**

UFR Sciences et Techniques

**UMR UFC/CNRS 6249 - Chrono-Environnement**

**UMR UFC/CEA E4**

## **Le tritium de l'Ecosystème à l'Homme**

*Etude des mécanismes et des constantes qui régissent  
les équilibres et différentes voies de transfert*

Présentée par Pierre Le Goff

en vue de l'obtention du doctorat en  
Sciences de la vie et de l'environnement

Co-directeurs : Michel Fromm et Pierre-Marie Badot

Soutenue le 11 décembre 2013 devant le jury composé de :

<b>Jean-Claude AMIARD</b> (directeur de recherche, CNRS-Université de Nantes)	Rapporteur
<b>Philippe JEAN-BAPTISTE</b> (directeur de recherche, CNRS-CEA Saclay)	Rapporteur
<b>Michel FROMM</b> (professeur, CEA-CNRS-Université de Franche-Comté)	Directeur
<b>Pierre-Marie BADOT</b> (professeur, INRA-CNRS-Université de Franche-Comté)	Co-directeur
<b>Philippe GUETAT</b> (expert international, CEA HC)	Examineur
<b>Laurent VICHOT</b> (docteur, CEA Valduc)	Examineur



*A mon Amour, sans qui je ne serais rien,  
A mes enfants qui donnent du sens à tout.*

*« Quand j'aurais [...] la science de tous les mystères et de toute la connaissance,  
Si je n'ai pas l'Amour, je ne suis rien »*

*Saul de Tarse (dit Paul)*



# Remerciements

Je suis extrêmement heureux de pouvoir remercier ici tous ceux qui ont participé de près ou de loin à mon travail. Pour certains, cela fait longtemps que je pense à la manière dont je pourrais le mieux exprimer ma gratitude. Enfin, j'ai l'occasion de le faire !

Toute ma reconnaissance va d'abord aux personnes qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse : le Pr. Jean-Claude Amiard et le Dr. Philippe Jean-Baptiste. Vos travaux ont fait partie des sources de réflexion et d'inspiration qui ont guidé mon travail. C'est un honneur que de vous soumettre mes travaux.

Mon doctorat a été réalisé au sein du Laboratoire de Métrologie et de Surveillance de l'Environnement (LMSE), du Service de Protection contre les Rayonnements (SPR), du Département de Support Technique et Administratif (DSTA) du centre de Valduc, de la Direction des Applications Militaires (DAM), du Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA). Je remercie le Dr. Laurent Vichot et Mme Christelle Rich-Genin, respectivement ancien et actuel chef du LMSE pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans de très bonnes conditions. Je remercie également M. Laurent Jaskula, chef du SPR, pour s'être intéressé avec bienveillance à mes travaux, même quand parfois mes idées pouvaient paraître saugrenues. Merci au Dr. Catherine Treimany et au Dr. Jacques Cagnoux, respectivement ancien et actuel assistant scientifique du directeur de Valduc pour leur accompagnement durant cette aventure.

Ma plus sincère gratitude va vers M. Philippe Guétat, expert international, aujourd'hui chargé de mission auprès du Haut-commissaire à l'Energie Atomique, à qui je dois beaucoup dans cette thèse : merci de m'avoir fait confiance dès le début, d'avoir supervisé avec rigueur et permanence mes travaux et de m'avoir parfois un peu chahuté pour vous assurer que je ne perdais pas mes objectifs de vue. Avec le Dr. Laurent Vichot, ils ont été mes encadrants CEA et les initiateurs du sujet que j'ai eu un grand plaisir à traiter : je les remercie pour cela également.

Mes directeurs de thèse ont été les professeurs Michel Fromm et Pierre-Marie Badot, tous deux de l'UMR Chrono-Environnement (CNRS-CEA-INRA-Université de Franche-Comté). Merci d'avoir constitué une équipe pluridisciplinaire qui m'a permis de ne pas me perdre dans la grande diversité des problématiques que nous avons rencontrées au cours de mes travaux et de trouver même quelques réponses. Je vous remercie pour votre disponibilité, vos questions toujours pertinentes et pour m'avoir formé à la recherche.

Que ce soit à Valduc ou à l'Université de Franche Comté, j'ai eu l'occasion de travailler avec des personnes formidables. Je remercie en premier lieu l'équipe du LMSE qui a non seulement contribué à ce travail d'une manière ou d'une autre mais m'a surtout permis de passer trois ans dans une excellente ambiance de travail. Merci à Damien Baudry pour les coups de mains réguliers sur les Tricarb et le vocabulaire bourguignon, à David Bauduret pour les discussions intéressantes sur les mesures environnementales et les données météorologiques, à Cécile Boyer, précédente doctorante du LMSE, pour le passage de témoin et son aide pour mon intégration rapide dans l'équipe du laboratoire (qu'elle a appréciée

autant que moi), à Laurent Couchoux pour les super prélèvements (même quand les objets d'étude n'étaient pas ragoutants), les commandes efficaces et pour plein d'autres choses, à Olivier Croissant pour avoir supporté parfois mon encombrante proximité et d'avoir toujours accepté de me dépanner sur les mesures et les distillations quand nécessaire, à Jean-Marie Duda pour avoir eu la patience d'écouter mes hypothèses bizarres, de me faire passer un peu de sa rigueur statistiques (à  $\pm 3\sigma$ ) et d'avoir contribué à certains de mes travaux, à Françoise Dumoulin pour tous les services qui ne tiennent pas sur le Post it et d'avoir notamment fait des prélèvements pour ma thèse (parfois au péril de sa v... non... il ne faut pas non plus exagérer), à Julien Gauthier pour m'avoir communiqué un peu de ses convictions météorologiques, pour les coups de mains en HNO et les dépannages de VLAM, à Pauline Giuliani pour avoir maintenu le Tricarb\_09 en bonnes conditions météorologiques, à Florence Hillairet-de Boisferon pour avoir supporté la cohabitation parfois turbulente avec mes jeunes et pour les échanges lorsque nos manip respectives nous permettaient d'avoir un peu de temps de cerveau disponible, à Yvan Losset pour les discussions toujours enrichissantes sur le tritium et sa mesure et pour m'avoir montré que de sortir des sentiers battus ouvraient des perspectives illimitées, à Sophie Masson pour son affection énergique et les fous rire, à Antoinette Petit pour avoir toujours pris de son temps pour m'aider à trouver le matériel que je cherchais et pour avoir toujours montré de la bonne volonté à transmettre son esprit de laboratoire et d'équipe, à Ingrid Springinsfeld pour son accueil à mon arrivée et pour le maintien du contact après son départ, à Christophe Winkelmann pour notre amicale et feinte compétition. Merci pour votre amitié durant ces 3 ans. J'espère que nous garderons contact.

Mille mercis à Frédérique Poisot et Martine Gornouvel, du secrétariat du SPR, pour leur extrême indulgence lors de mes oublis ou raccourcis pris malgré moi et la bonne volonté dont elles ont fait preuve pour me dépanner ! Merci à Nadège Sierra et Nathalie Viallet, de la documentation de Valduc, pour avoir tout fait pour me transmettre rapidement les éléments de bibliographies que je cherchais. Merci également de m'avoir facilité l'emprunt des livres et d'avoir fait preuve de tant de compréhension pour mes retards dans le retour des ouvrages.

Je remercie également ceux qui ont constitué mon équipe durant ces 3 ans : Mlle Pauline « senpai » Rambaud, Mlle Sabrina Bornot, M. Benjamin Deville, M. Gauthier Doillon et M. Sébastien Meuret (double merci). Si votre expérience à mes côtés vous a apporté autant que votre aide à mes travaux, alors le contrat a été rempli. Merci en tout cas d'avoir accepté les changements de caps parfois brutaux motivés par les résultats en cours d'acquisition et merci pour votre investissement durant votre présence à Valduc. Je vous souhaite bonne continuation et plein de bonnes choses pour la suite : le meilleur reste à venir !

Merci au Dr. Christophe Mavon, ingénieur de recherche au Laboratoire de Chimie, Physique et Rayonnements-Alain Chambaudet puis à l'UMR Chrono-Environnement pour son aide technique toujours donnée avec bonne volonté et diligence. Merci à lui également ainsi qu'au Pr. Nicolas Capelli pour avoir participé à la plupart des points de thèse qui ont jalonné ces trois ans. Merci à Caroline Amiot pour son aide technique lors des manip complémentaires pour mon premier article.

Merci à l'équipe de l'UMR STLO (INRA de Rennes) pour l'intérêt qu'elle a montré à mes travaux. Merci surtout au Dr. Frédéric Gaucheron pour avoir accepté de collaborer à certains des travaux de ma thèse et à Mme Nadine Lecomte pour m'avoir fait bénéficier de son expérience technique et de sa maîtrise des process que nous avons mis en œuvre.

De chaleureux remerciements pour tous les exploitants agricoles que j'ai eu le plaisir de rencontrer durant mes travaux. Je n'ai pas eu le temps d'explorer toutes les questions que j'aurais souhaité et je n'ai donc pas exploité directement toutes les informations que vous m'avez fournies, mais c'est certain que tous nos échanges m'ont permis de constituer le cadre expérimental de ma thèse.

Merci à mes amis du *cheezy-chipsy* qui, même lorsque mon sujet n'était pas en phase avec leurs convictions, ont toujours montré une curiosité bienveillante envers mes travaux et m'ont soutenu. J'espère de tout cœur que nous aurons bientôt plus d'occasions de nous voir et de pouvoir partager à nouveau. Merci également aux autres d'avoir maintenu le contact même lorsque je ne montrais plus la disponibilité suffisante.

Je ne pense pas que j'aurais pu venir à bout de ma thèse si ma famille n'avait pas été là. L'occasion m'est enfin donnée de graver dans le marbre ma profonde gratitude. Je remercie d'abord ma sœur Kristen : sans toi, cette expérience n'aurait juste pas été possible. Merci pour avoir donné l'impulsion initiale. Merci à mes frères, Eric et Vincent, à mes belles-sœurs, Claire et Isadora, ainsi qu'à mon beau-frère Olivier, d'avoir suivi la progression de mes travaux. Merci bien sûr à mes parents pour m'avoir toujours permis de réaliser mes études très sereinement et de m'avoir donné leur Amour inconditionnel. Que vous puissiez être fiers de moi fait partie de mes moteurs. Ma famille s'est agrandie il y a maintenant plus de 6 ans et depuis (notamment durant les 3 années qui viennent de s'écouler), ma belle-famille a répondu « présent ! » à chaque fois que nous en avons besoin. Mes plus chaleureux remerciements à Gérard et à Dany, mes beaux-parents, qui ont permis que nos projets de couple et de famille ne s'arrêtent pas durant ma thèse. Je ne dirais jamais assez merci pour le temps et l'énergie que vous nous avez donnés. J'espère ne pas avoir abusé et que ma gratitude ainsi que mon affection sont des évidences pour vous. Merci à mes beaux-frères, Thibaut et Guillaume pour leur aide également ainsi que l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Je souhaite que vos nombreux projets soient couronnés de succès. Je remercie mes filleuls, Baptiste, Maylis et Marius, de leur patience. Ces dernières années, je n'ai pas été disponible mais mon amour et mes pensées vous accompagnent chaque jour et je compte bien faire en sorte que nos relations soient plus intimes.

Enfin, à toi, Caroline, mon unique Amour, pour être toi chaque jour. Je te serai éternellement redevable de m'avoir porté, supporté, encouragé, aidé, rassuré, détendu, préservé, soigné, écouté, nourri, logé, blanchi, lu et relu pendant ces 3 ans. Tu es ma Force, mon Energie et mon Envie. Merci d'avoir pris patience, d'avoir enduré et de t'être réjouie avec moi. Mon Amour ne passera jamais. Toutes mes pensées vont bien évidemment à nos fils, Gwenn, Ewan et Mahé. Mon travail ne m'a pas toujours permis d'être auprès de vous autant que nous l'aurions souhaité mais mon cœur est vôtre et tout ce que je fais aujourd'hui, c'est pour vous. Vous êtes ma plus grande joie.

# Table des matières

Remerciements .....	I
Table des matières .....	IV
Table des figures .....	VI
Table des tableaux .....	X
Introduction .....	1
Partie 1. Le tritium dans la biosphère Etat des connaissances.....	9
1. Métrologie du tritium .....	12
1.1. Prélèvements et stockage des échantillons .....	12
1.2. Méthodes de mesures du tritium .....	18
1.3. La mesure du tritium dans des matrices complexes .....	21
2. Echange labile .....	24
3. Le tritium dans l'environnement .....	26
3.1. Émissions de tritium dans l'environnement .....	26
3.2. Transformation du HT en eau l'importance des micro-organismes du sol .....	29
3.3. De l'eau à la matière organique : le rôle primordial des végétaux .....	30
4. Données sanitaires du tritium .....	37
4.1. Voies d'exposition au tritium .....	37
4.2. Pour l'évaluation dosimétrique d'une exposition à des molécules tritiées .....	45
Partie 2. Matériel et méthodes .....	59
1. Descriptions des techniques analytiques .....	60
1.1. La mesure du tritium .....	60
1.2. Préparation des échantillons - Généralités .....	67
1.3. Préparation des échantillons - Particularités .....	75
2. Etude environnementale de marquage chronique au tritium.....	80
2.1. Choix de la chaîne alimentaire .....	80
2.2. Suivi environnemental du site de Valduc .....	81
2.3. Tritiation des végétaux en conditions environnementale .....	82
2.4. Tritiation des animaux en conditions environnementales .....	84
Partie 3. Vers une plus juste évaluation du marquage tritium .....	89
1. Stockage des échantillons.....	90
2. Déshydratation .....	92
2.1. Influence de la technique de déshydratation .....	92
2.2. Influence de la masse de l'échantillon .....	97
2.3. Influence de l'état de déshydratation.....	100
2.4. Le volume mort : effets cumulés de plusieurs sources de biais .....	106
3. Etude de la discrimination isotopique : éléments mathématiques et conceptuels.....	111
3.1. Fractionnement isotopique conduisant à l'eau libre des organismes .....	112
3.2. Fractionnement isotopique de l'hydrogène, de l'eau libre au TOL .....	115
3.3. Le fractionnement isotopique de l'hydrogène entre l'eau libre et le TOLne .....	117
3.4. Fractionnement isotopique après la photosynthèse .....	127
3.5. Conclusions .....	128
4. Autre méthode de traitement de l'eau de combustion.....	130



Partie 4. Le marquage des végétaux par le tritium .....	135
1. 1 <sup>ère</sup> campagne de prélèvements .....	137
1.1. TOLne et croissance .....	137
1.2. TOLne en fonction de l'espèce prélevée .....	138
1.3. TOLe et TOLne .....	141
2. Deuxième campagne de prélèvements .....	143
2.1. Evolution du tritium total .....	144
2.2. Comparaison de la tritiation de différents composants .....	149
2.3. Evolution du TOLne .....	152
Partie 5. Le marquage du lait par le tritium .....	157
1. Conditions d'élevage .....	158
1.1. Localisation des cheptels .....	158
1.2. Abreuvement .....	159
1.3. Alimentation .....	159
2. Tritiation des constituants du lait .....	163
2.1. Composition du lait .....	163
2.2. Répartition du tritium dans un lait .....	168
3. Comparaison entre les laits des 4 exploitations .....	171
3.1. Comparaison de l'eau libre et de la matière sèche .....	171
3.2. Comparaison des fractions du lait .....	172
3.3. Eau d'abreuvement et alimentation .....	176
4. Suivi d'une exploitation .....	182
5. Synthèse des résultats sur le lait .....	185
Partie 6. Circulation du tritium dans un écosystème .....	191
1. De l'émissaire au point de mesure .....	192
1.1. Circulation atmosphérique .....	192
1.2. Transferts Air/Sol et Air/Eau .....	193
2. L'intégration dans les plantes depuis l'atmosphère et le sol .....	195
2.1. HTO : de l'environnement à l'eau libre .....	195
2.2. De l'eau libre au TOLe .....	196
2.3. Fractionnement isotopique lors de la synthèse de TOLne .....	197
3. Intégration du tritium par les animaux .....	198
3.1. L'eau libre et le TOLe .....	199
3.2. Le TOLne dans le lait .....	200
Conclusion .....	205
Glossaire .....	213
Bibliographie .....	231
Communications scientifiques .....	259

# Table des figures

Figure 1-1 : Profil de l'énergie libre pour la réaction $A-H + C \rightarrow A + C-H$ . Les vibrations moléculaires du substrat marqué (A-H vs. A-D vs. A-T), du produit marqué (C-H vs. C-D vs. C-T) et de l'état de transition (A--H--C vs. A--D--C vs. A--T--C) sont superposées au potentiel énergétique global de la réaction. Dans la Figure 1-1 a, les fréquences vibrationnelles de l'état de transition sont diminuées comparées à celles de l'état fondamental. Dans la Figure 1-1 B, elles sont augmentées. (Klinman, 2006) .....	11
Figure 1-2 : Activité atmosphérique en HTO et temps de barbotage minimums théoriques pour atteindre le seuil de décision ( $2,4 \text{ Bq L}^{-1}$ ) dans le premier pot de prélèvement (à une température de $20^\circ\text{C}$ et à 60 % d'humidité relative, débit de prélèvement de $30 \text{ L h}^{-1}$ , 150 mL d'eau initialement dans le flacon) .....	15
Figure 1-3 : Schéma d'analyse du tritium dans les échantillons de l'environnement (Baglan <i>et al.</i> , 2010) .....	21
Figure 1-4 Evolution de la teneur en tritium dans l'eau de pluie de 1958 à 1990 exprimée en Unité Tritium (UT) et en Bq/L (IRSIN, 2009).....	27
Figure 1-5 Comparaison des rejets annuels en tritium de l'industrie nucléaire civile et de la production annuelle de tritium naturel (UNSCEAR)(March et Besnus, 2010) .....	28
Figure 1-6 : Les flux de sucre entre le chloroplaste et le cytoplasme. Le triose phosphate produit dans le chloroplaste par le cycle de Calvin est appauvri en tritium par rapport à l'eau. Le triose phosphate est transporté vers le cytoplasme qui devient enrichi en tritium durant les réactions telles que la glycolyse ou la glycogénèse (adapté de Luo et Sternberg, 1991).....	33
Figure 1-7 : Concentration en tritium de l'eau libre (en pCi/ml) et de TOL (en pCi/g) dans un tournesol ( <i>Helianthus annua</i> ) sept heures après une exposition d'une demie-heure à de la vapeur tritiée (Koranda et Martin, 1972) $1 \text{ pCi} = 3,7 \cdot 10^{-2} \text{ Bq}$ .....	34
Figure 1-8 : La différence entre les valeurs de la cellulose et du nitrate d'amidon ( $\delta D_{\text{cell-star.}}$ ) et celles de l'amidon ( $\delta D_{\text{starch}}$ ) pour les plantes C3 (O) et CAM (●). La relation entre $\delta D_{\text{cell-star.}}$ et $\delta D_{\text{starch}}$ était très significative pour les plantes C3 et CAM avec respectivement un $R^2 = 0,898$ , $p < 0.01$ et $R^2 = 0,685$ , $p < 0.01$ (Luo et Sternberg, 1991).....	35
Figure 2-1 : Représentation schématique du dispositif d'extraction du tritium organiquement lié (Boyer, 2009) .....	64
Figure 2-2 : Schéma d'un évaporateur rotatif .....	70
Figure 2-3 : Schéma de fonctionnement du lyophilisateur Heto Drywinner PL 3000 modifié par l'utilisation d'un insert en verre dans le piège froid .....	71
Figure 2-4: Schematic diagrams of the apparatus used for "sequential distillations" .....	74
Figure 2-5: Schéma technologique de séparation des principaux constituants organiques du lait tel que proposé par l'INRA .....	77

Figure 3-1 : Variation de l'activité volumique de l'eau de Volvic continue dans un flacon ouvert au cours du temps.....	90
Figure 3-2 : Comparaison de la distribution des activités volumiques mesurées sur l'eau libre extraite par chacune des 3 techniques de déshydratations étudiées .....	92
Figure 3-3 : Comparaison de l'activité volumique mesurée sur une eau pure tritiée après ou sans traitement complémentaire (distillation ou lyophilisation) .....	93
Figure 3-4 : Activité volumique de l'eau libre du lait extraite par lyophilisation à Besançon et à Valduc.....	94
Figure 3-5 : Activité volumique de l'eau extraite en fonction de la masse de l'échantillon traité et normalité de la distribution de la densité des activités volumiques. ....	98
Figure 3-6 : Taux d'eau extraite en fonction de la masse fraîche d'échantillon .....	99
Figure 3-7 : Evolution de l'activité volumique de l'eau extraite en fonction de l'état de déshydratation .....	100
Figure 3-8 : Extraction de HTO durant une distillation d'un mélange pur HTO/H <sub>2</sub> O en fonction du taux de déshydratation .....	103
Figure 3-9: Evolution de l'activité volumique des aliquotes d'eau extraite au cours de l'extraction de l'eau libre .....	103
Figure 3-10 : Evolution de l'activité volumique des aliquotes de l'eau extraite au cours de l'extraction d'eau.....	105
Figure 3-11 : Evolution de l'activité volumique de l'eau extraite au cours de son extraction .....	105
Figure 3-12 : Modélisation de l'évolution de l'activité volumique extraite instantanée et des activités volumiques de l'eau dans le réfrigérant et le distillat d'un évaporateur rotatif .....	108
Figure 3-13: Evolution modélisée de l'activité volumique de l'eau dans les différents compartiments de l'évaporateur rotatif durant la distillation d'un échantillon de 20 g de lait (activité volumique moyenne de l'eau extraite = 1).....	108
Figure 3-14 Evolution du biais du à l'évaporateur rotatif en fonction de la masse de l'échantillon traité. ....	109
Figure 3-15 : Vitesse d'échange du TOLe de plants de maïs séchés et réduits en poudre dans un air ambiant à 30,1 % d'humidité relative .....	116
Figure 3-16 : (a) Tous les hydrogènes de la molécule sont remplacés par du tritium (b) Les tritium en position labile (les tritium échangeables) ont été remplacés par du protium. ....	119
Figure 3-17 : Evolution mesurée et modélisée du TOLt de grains de blé en fonction de l'activité volumique de l'eau atmosphérique et de la croissance des grains de blé .....	126
Figure 4-1 : Chronique des directions et vitesses de vents du 1 <sup>er</sup> avril au 6 juin 2012 et modélisation de la croissance des cultivars durant cette période (blé d'hiver pris comme exemple).....	137

Figure 4-2 : Fréquence des origines des vents entre le 1 <sup>er</sup> avril et le 6 juin 2012 et activités volumiques de l'eau de combustion du TOLne des échantillons prélevés le 6 juin 2012 en fonction du lieu de prélèvement .....	138
Figure 4-3 : Activité volumique moyenne de la vapeur d'eau atmosphérique aux différents points de prélèvements obtenue par le code calcul GASCON pour la période entre le 1 <sup>er</sup> avril et le 18 juin 2012 .....	139
Figure 4-4 : TOLne mesuré dans le blé (a), l'orge (b) et le colza (c) en fonction du lieu de prélèvement .....	140
Figure 4-5 : TOLne et TOLe mesurés sur les échantillons prélevés autour de Valduc le 6 juin 2012 .....	141
Figure 4-6 : Activité volumique de l'HTO atmosphérique et du tritium total des échantillons prélevés (a) Orge à Salives – (b) Blé à Moloy – (c) Orge à Léry – (d) Blé à Echallot .....	145
Figure 4-7 : Vitesses et directions de vents mesurés à Valduc au cours des périodes de prélèvements atmosphériques. Les cadres rouges délimitent les 12 heures qui ont précédé les prélèvements.....	146
Figure 4-8 : Comparaison des activités volumiques de l'eau de combustion des fibres, du gluten, de l'amidon et des fractions solubles d'épis de blé et d'orge après rinçage isotopique (TOLne).....	150
Figure 4-9 : Comparaison de l'activité volumique de l'eau de combustion de la matière sèche après rinçage isotopique (TOLne) des cosses et de l'huile de Colza prélevé à Moloy, corrigée (b) ou non (a), par la contribution de l'hydrogène non-échangeable à l'hydrogène total de la fraction considérée .....	150
Figure 4-10 : Comparaison des valeurs de TOLne mesurées sur l'Orge prélevé à Moloy avec les valeurs modélisées en fonction de leur croissance et de l'activité volumique de la vapeur d'eau atmosphérique d'après (25) .....	152
Figure 5-1 : Suivi de l'activité volumique des eaux de consommation de villages voisins de Valduc .....	159
Figure 5-2 : Composition de la masse fraîche du bol alimentaire des cheptels laitiers suivis	160
Figure 5-3 : Composition de la masse sèche du bol alimentaire des cheptels suivis .....	161
Figure 5-4 : Composition nutritionnelle des rations alimentaires des cheptels suivis .....	161
Figure 5-5 : Origine des nutriments organiques composants la ration alimentaire.....	162
Figure 5-6 : Composition massique (g) d'un kilogramme du lait de Larçon prélevé le 4 juin 2012.....	163
Figure 5-7 : Différents types d'interactions protéines/eau (in Snappe <i>et al.</i> , d'après Cayot et Denis, 1998) .....	164
Figure 5-8 : Formule en perspective d'une molécule de lactose .....	165
Figure 5-9 : Une micelle de caséine représentée selon le modèle « Structure ouverte » (in Snappe <i>et al.</i> ).....	167

Figure 5-10 : Activité volumique de l'eau libre et du TOLne des principales fractions organiques du lait de Larçon prélevé le 4 juin 2012 .....	168
Figure 5-11 : Contribution des principaux composés hydrogénés à l'activité tritium du lait de Larçon prélevé le 4 juin 2012. Valeurs exprimées en Bq kg <sup>-1</sup> de lait frais .....	169
Figure 5-12 : Activité volumique de l'eau libre et activité volumique corrigée du TOLne des principales fractions organiques du lait de Larçon prélevé le 4 juin 2012.....	169
Figure 5-13 : Activité volumique de l'eau libre et de l'eau de combustion de la matière sèche des laits prélevés à Larçon, Moloy, Lamargelle et Echallot le 6 mai 2013.....	172
Figure 5-14 : Activité volumique de l'eau libre (TFWT) et de l'eau de combustion de la matière sèche (TOLt) des fractions organiques des 4 laits prélevés le 22 juin 2011. ....	173
Figure 5-15 : Activité volumique de l'eau libre (TFWT) et de l'eau de combustion de la matière sèche des fractions organiques des 4 laits prélevés le 5 juin 2013.....	174
Figure 5-16 : Activité volumique de l'eau libre (TFWT) et du TOLne corrigée par la contribution relative de l'hydrogène non-échangeable à l'hydrogène total pour les principales fractions organiques des 4 laits prélevés le 22 juin 2011. ....	175
Figure 5-17 : Activité volumique de l'eau libre (TFWT) et du TOLne corrigée par la contribution relative de l'hydrogène non-échangeable à l'hydrogène total pour les principales fractions organiques des 4 laits prélevés le 6 mai 2013 .....	175
Figure 5-18 : Comparaison des activités volumiques de l'eau des villages et des TFWT des laits collectés au cours des deux campagnes de prélèvements.....	177
Figure 5-19 : Activité volumique de l'eau de combustion de la matière sèche des aliments des cheptels suivis après rinçage labile comparée à celle des principales fractions organiques des laits collectés .....	179
Figure 5-20 : Activité volumique corrigée des différents nutriments composants le bol alimentaire .....	180
Figure 5-21 : Variations des activités volumiques des eaux de combustion des fractions organiques du lait de l'exploitation de Larçon, de l'eau libre du lait, de l'eau d'abreuvement et de l'eau atmosphérique entre le 8 avril 2013 et le 8 juillet 2013 .....	183
Figure 5-22 : Comparaison des variations de l'activité volumique de l'eau de combustion de la matière grasse du lait avec celles de l'eau libre du lait et de la température maximum atteinte la veille du prélèvement.....	185
Figure 5-23 : Cercle des corrélations d'une analyse par composantes principales réalisée sur l'ensemble des échantillons de lait traités (l'étiquette « Caséines » est sous l'étiquette « MS_ser.ac. »).....	186

# Table des tableaux

Tableau 1-1 : Propriété physiques d'eaux aux compositions isotopiques différentes (Jacobs, 1968).....	10
Tableau 1-2 : Activité en OBTt (en $\mu\text{Ci g}^{-1}$ de masse fraîche) de différents organes le lendemain d'une injection d'eau tritiée chez des rats sub-adultes (Thompson, 1952).....	40
Tableau 1-3 : Exemple de tritiation hétérogène entre des molécules et des tissus de rats suite à une exposition aiguë à de l'HTO (exprimé en $\mu\text{Ci g}^{-1}$ dry weight) (Thompson et Ballou, 1954).....	40
Tableau 1-4 : Concentration relative en OBT de la matière sèche de différents organes de rats après une exposition chronique à différentes molécules tritiées (d'après (Takeda, 1991).....	41
Tableau 1-5 : Quantité totale de tritium excrété par les urines et les fèces chez le rat lorsqu'il est exposé chroniquement à différentes molécules tritiées (Takeda, 1991) .....	43
Tableau 1-6 : Estimation des demi-vies des composantes de l'OBT de différents organes et leur contribution relative à l'OBT de l'organe suite à l'injection d'eau tritiée chez des souris adultes (demi-vie biologique de l'eau tritiée chez la souris : 3,3 jours) (d'après Thompson, 1952).....	50
Tableau 1-7 : Données biocinétiques pour la rétention du tritium chez les adultes et les enfants, (Harrison <i>et al.</i> , 2002).....	50
Tableau 1-8 : Différents effets sanitaires induits par des expositions à des molécules tritiées	51
Tableau 1-9 : Coefficients de doses retenus par la CIPR pour l'HTO et le TOL selon l'âge de la personne exposée d'après (Hill et Johnson, 1993) .....	54
Tableau 3-1 : Masse et activité volumique de l'eau condensée lors de lyophilisation à vide menées à Valduc.....	95
Tableau 3-2 : Moyenne et écart-type du taux d'eau extrait et de l'activité volumique mesurée sur les différents groupes d'échantillons .....	98
Tableau 3-3 : Fraction échangeable de l'hydrogène de molécules organiques majeures estimées à partir de calculs stœchiométriques.....	115
Tableau 3-4 : Des exemples de ratios TOLne/HTO avec une correction proposée afin d'évaluer le fractionnement isotopique .....	121







# Introduction

Le tritium est le seul **isotope** naturel radioactif de l'hydrogène. Il est actuellement parmi les principaux **radionucléides** émis dans l'environnement par les industries nucléaires. L'hydrogène est un des éléments majeurs à la surface de la Terre. Il est présent dans tous les compartiments **biotiques** et **abiotiques** de notre environnement. Il est un élément essentiel à la vie, qu'il soit sous forme d'eau ou de molécules organiques. Il est constitutif du vivant. Ainsi, le tritium peut être présent dans chacun de ces compartiments. Mais comment circule-t-il dans l'environnement à partir de son émission ?

Lors de sa découverte, le tritium était très difficilement perceptible tant sa fréquence isotopique dans la nature (estimée à un **atome** de tritium pour  $10^{18}$  **atomes** d'hydrogène) et l'énergie de son rayonnement sont faibles. Cependant, l'augmentation des rejets de tritium dans l'environnement, que ce soit au niveau global suite aux essais atmosphériques d'armes thermonucléaires ou, plus localement, à proximité d'industries diverses, ont fait surgir des questions quant à la toxicité du tritium et à sa capacité à être intégré au vivant. Les recherches actuelles sur la fusion nucléaire pour la production d'énergie civile et la construction d'**ITER** à Cadarache, entretiennent les débats autour des risques liés à l'émission de tritium dans l'environnement.

Etant un **isotope** de l'hydrogène et ayant un rayonnement de faible énergie, le tritium est réputé peu radiotoxique. Cependant, compte tenu de sa grande mobilité et de son **ubiquité**, l'évaluation de son impact sanitaire pourrait être modifiée s'il est capable de se concentrer sensiblement dans certains compartiments environnementaux.

Les écarts de masse entre le **protium** et le tritium induisent des différences sensibles dans les propriétés des deux **isotopes**, comme par exemple dans les propriétés physiques de l'eau tritiée par rapport à l'eau : températures de fusion, d'évaporation mais également **pKa** ou **cinétique** des réactions chimiques. Ces différences sont susceptibles d'induire des processus discriminants au cours de la circulation du tritium dans l'environnement. La question est de savoir quelle est l'importance des ces phénomènes d'un point de vue quantitatif.

Cette question est rendue délicate par la multitude et la complexité des mécanismes physico-chimiques et biochimiques qui concernent l'hydrogène dans la nature. La diversité de ses

sources et de ses voies de transferts est un obstacle supplémentaire à la quantification des rapports isotopiques et à leur comparaison entre compartiments.

Les végétaux, étant à la base des chaînes alimentaires et ayant la capacité de synthétiser de la matière organique à partir d'eau (qui peut être tritiée) et de dioxyde de carbone, leur tritiation est l'objet d'un grand nombre d'études. Celles-ci ont permis notamment de mettre en évidence l'importance de l'exposition des parties aériennes à de la vapeur d'eau dans la synthèse de Tritium Organiquement Lié (TOL) ou de montrer que l'exposition nocturne est susceptible d'induire des marquages différents de ceux liés à une exposition diurne. La **cinétique** de l'intégration du tritium à la matière sèche a également été étudiée sur plusieurs espèces. Aucune comparaison de la tritiation des molécules constitutives du végétal n'a été publiée à ce jour.

Différentes études ont consisté également à l'exposition d'animaux ou de cellules à différentes molécules tritiées (eau, **glucose**, **thymidine**, etc.) afin de mesurer les incidences de ces expositions et de comprendre les mécanismes en jeu. Il a été démontré que le très faible parcours de l'électron émis lors des **transmutations** d'**atomes** de tritium conduit à une distribution hétérogène de l'**ionisation** au sein même de la matrice où elle s'est produite. La connaissance de la nature de la molécule tritiée, dont dépend la probabilité de présence dans des compartiments critiques du vivant (comme le noyau de la cellule) est donc également nécessaire.

Nous présentons ici une étude d'un écosystème terrestre, les environs du centre CEA de Valduc, exposé chroniquement à des rejets atmosphériques de tritium depuis maintenant plus de 50 ans. Ces rejets sont réguliers et stables depuis une dizaine d'années, après une forte diminution. L'intérêt de ce site d'étude tient essentiellement au fait que l'activité tritium y est suffisante dans la plupart des compartiments environnementaux pour être mesurée avec des incertitudes de mesure modérées et à l'absence de rejets d'autres **radionucléides** pouvant interférer dans les mesures de tritium. Le centre de Valduc étant entouré d'exploitations agricoles, notamment d'élevage, il y est possible de suivre la chaîne alimentaire d'un cheptel bovin dans son ensemble (air – eau – aliments – lait produit). L'étude consiste donc à suivre la tritiation des végétaux cultivés au cours de leur croissance puis de mesurer l'activité tritium du lait des cheptels nourris, entre autres, avec les végétaux suivis.

Des données antérieures (de laboratoire, de terrain ainsi que celles de la surveillance du site) fournissent des indications sur les transferts du tritium entre compartiments. Les questions sur l'intégration de l'hydrogène de l'eau dans la matière organique et sur la **discrimination isotopique** de l'hydrogène au cours notamment des réactions métaboliques restent des questions ouvertes. Dans cette étude, tout en balayant les différents maillons de la chaîne alimentaire, nous chercherons à aller plus loin dans le détail et dans la réalité de la tritiation de la matière organique, sachant que celle-ci conduit à des **expositions** radiologiques significativement plus élevées que l'eau tritiée. Cette approche conduit naturellement à se poser la question de ce qui compose le **TOL** du radioanalyste. On verra que cette question constitue un élément non négligeable dans l'expression et l'interprétation des résultats de mesure.

Cette étude vise à répondre à différentes questions :

- Quels sont les facteurs qui influencent la circulation du tritium dans un écosystème continental ?
- Quelles sont les constantes qui régissent les transferts entre compartiments ?
- La tritiation dans un système donné est-elle homogène ou existe-t-il des variations sensibles des rapports isotopiques ?
- Est-ce que la tritiation des maillons d'une chaîne alimentaire exposée chroniquement est constante ou varie-t-elle le long des niveaux trophiques ?

Par une étude bibliographique sur le tritium dans l'environnement en général et dans la biosphère en particulier, nous dresserons d'abord un état des connaissances sur le tritium, ses propriétés, les techniques de mesures et sa capacité à intégrer les différents compartiments qui constituent l'environnement. Cette partie fournit des éléments d'information sur les effets sanitaires du tritium sous différentes formes chimiques. L'intérêt porté aux molécules organiques tritiées est justifié, ainsi que la distinction nécessaire entre elles et le **TOL**.

Nous développons ensuite la démarche expérimentale suivie. Nous présentons d'abord les différentes expériences de laboratoire visant à valider la méthodologie nécessaire pour obtenir des mesures pertinentes du tritium dans les conditions de notre étude. Les modalités de l'étude environnementale sont alors exposées, en présentant notamment les différentes

exploitations suivies ainsi que les conditions de prélèvements et de mesures réalisés au cours de la thèse.

La première partie expérimentale présente les résultats obtenus concernant la méthodologie de la mesure et de la métrologie du tritium dans des matrices biologiques. L'importance du stockage ainsi que des conditions du traitement des échantillons est démontrée. Une revue critique de la **discrimination isotopique** telle qu'elle est présentée dans la littérature permet de mettre en évidence un écueil dans l'évaluation de celle-ci. Une correction est proposée.

La deuxième partie expérimentale présente les résultats obtenus au cours des différentes campagnes de prélèvements de végétaux menées au cours de la thèse. Ces résultats permettent de mettre en évidence l'influence de l'espèce sur la tritiation de la matière sèche ainsi que la corrélation entre la situation géographique des points de prélèvements et les mesures faites sur le **TOL** de ces échantillons. Des considérations plus générales quant aux méthodes employées dans les études environnementales sont également évoquées à la lumière de certains résultats. La comparaison de différentes fractions d'un organe végétal permet d'apporter des éléments de réponse sur la constance ou non du rapport isotopique.

Dans la dernière partie expérimentale, sont présentés les résultats obtenus sur les laits produits autour de Valduc. La comparaison de la tritiation des laits produits autour de Valduc et, plus précisément des principales fractions les composant (eau, **matière grasse**, **caséines**, **lactose** et **protéines sériques**) permet d'apporter d'autres éléments de réflexion sur l'homogénéité de la tritiation dans une matrice donnée. La comparaison des rapports isotopiques des laits pour les différentes pratiques agricoles permet de préciser l'influence de ces dernières dans la tritiation de produits animaux. Le suivi d'une exploitation sur près de 3 mois révèle l'importance des variations du métabolisme des animaux sur la tritiation telle qu'elle est observée en conditions d'exposition relativement stables.

La synthèse des résultats est alors effectuée et la discussion est menée sous l'angle des voies de transferts et d'intégration des molécules tritiées (eau et molécules organiques) dans les maillons successifs de la chaîne alimentaires. Nous évoquons ainsi les facteurs influençant les

différents transferts entre compartiments tels qu'ils sont décrits dans la bibliographie et qu'ils apparaissent à la lumière des résultats obtenus au cours de cette étude.

Les limites des différentes démarches ou des résultats obtenus sont présentées afin de proposer des voies d'amélioration qui permettront l'obtention de résultats plus robustes ou d'une portée plus large.

Dans la conclusion, les principaux résultats sont synthétisés et mettent en avant les apports de la thèse sur la tritiation d'un écosystème continental en situation d'exposition chronique. Les considérations plus générales qui ont été les préalables nécessaires à l'étude environnementale sont également soulignées. Nous proposons des perspectives de recherches telles qu'elles nous apparaissent à la lumière de notre travail.







# **Partie 1. Le tritium dans la biosphère**

## **Etat des connaissances**

Le tritium (T ou  $^3\text{H}$ ) est l'**isotope** radioactif de masse 3 de l'hydrogène. Sa **demi-vie** est de 4500 jours  $\pm$  8 jours (soit 12 ans et 4 mois) (Lucas et Unterweger, 2000 ; Unterweger *et al.*, 1980) et émet un **rayonnement  $\beta^-$**  de faible énergie ( $E_{\text{moyenne}} = 5,7 \text{ keV}$  et  $E_{\text{max}} = 18,6 \text{ keV}$ ) et un **atome** d' $^3\text{He}$ . Le parcours maximal de son rayonnement est de 5 mm dans l'air et de 6  $\mu\text{m}$  (0,56  $\mu\text{m}$  en moyenne) dans l'eau et les tissus biologiques (Hill et Johnson, 1993). On estime la teneur moyenne du tritium dans la nature à un **atome** de tritium pour  $10^{18}$  **atomes** d'hydrogène (Grosse *et al.*, 1951).

Le tritium a les mêmes propriétés chimiques que les **isotopes** stables de l'hydrogène (Grosse *et al.*, 1951). Il peut donc intégrer toute molécule hydrogénée (IRSN/DEI, 2010 ; Stan-Sion *et al.*, 2009). Avec une différence de masse importante (facteur 3), mais un rayon atomique voisin : rayon de Van der Waals = 1,09 nm (Lide, 2008), la question de la **discrimination isotopique** du tritium par rapport aux autres **isotopes** de l'hydrogène est une question d'actualité, qui anime la communauté scientifique. Le **Tableau 1-1** montre quelques unes des différences de propriétés physiques observées entre l'eau formée de différents **isotopes** de l'hydrogène.

**Tableau 1-1 : Propriété physiques d'eaux aux compositions isotopiques différentes (Jacobs, 1968)**

	H <sub>2</sub> O	D <sub>2</sub> O	HTO	T <sub>2</sub> O
Densité maximale (g cm <sup>-3</sup> )	1,000	1,106		1,215 (1)
Masse molaire (g mol <sup>-1</sup> )	18,0153	20,0275 (2)	20,0235	22,0315
Température de fusion (°C)	0,00	3,81	4,48	4,48
Température d'ébullition (°C)	100,00	101,42	101,51	101,52 (1)
Point triple (°C)	0,01	3,82	2,25	4,49 (1)
pH à 25°C	7,00	7,41		

(1) (Belovodski *et al.*, 1985) - (2) (CRC, 2008)

Lors de la substitution isotopique dans une **liaison covalente**, il n'y a pas de variation des termes énergétiques de nature électronique. En revanche, les mouvements vibrationnels, rotationnels et translationnels, liés à la masse des **atomes**, sont modifiés, à la fois pour l'état fondamental et l'état de transition. La **Figure 1-1** représente graphiquement l'effet de la substitution isotopique sur la vibration moléculaire et l'énergie d'activation pour la réaction  $\text{A-H} + \text{C} \rightarrow \text{A} + \text{C-H}$ . On estime généralement que le tritium est moins rapidement intégré que le **protium** dans une molécule mais que sa **liaison covalente** est plus stable (Grosse *et al.*, 1951). Cependant, les situations d'**hydrogénation** et d'**hydrolyse (biotique/abiotique)**, avec

ou sans **catalyseur**, etc.) sont multiples dans le vivant et peuvent conduire à des situations contrastées (Kirchmann, 1972 ; Klinman, 2006).

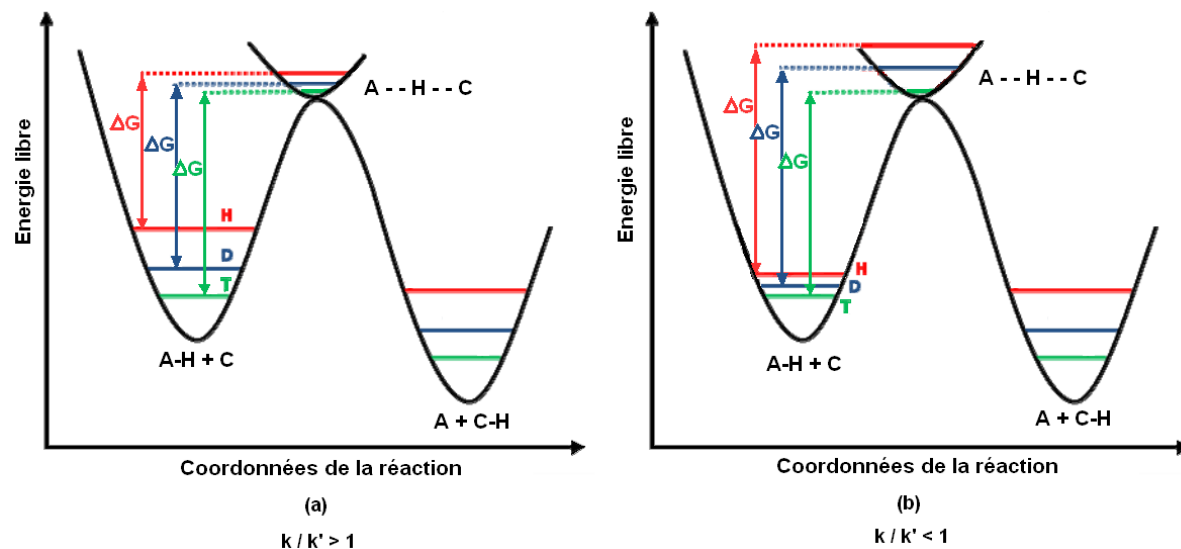


Figure 1-1 : Profil de l'énergie libre pour la réaction  $A-H + C \rightarrow A + C-H$ . Les vibrations moléculaires du substrat marqué (A-H vs. A-D vs. A-T), du produit marqué (C-H vs. C-D vs. C-T) et de l'état de transition (A--H--C vs. A--D--C vs. A--T--C) sont superposées au potentiel énergétique global de la réaction. Dans la Figure 1-1 a, les fréquences vibrationnelles de l'état de transition sont diminuées comparées à celles de l'état fondamental. Dans la Figure 1-1 B, elles sont augmentées. (Klinman, 2006)

Compte tenu de la nature et de la faiblesse de son rayonnement, le tritium conduit uniquement à une **exposition interne** (Hill et Johnson, 1993). Celle-ci intervient essentiellement après ingestion d'eau tritiée ou de molécules organiques tritiées ou encore par inhalation et par absorption cutanée, surtout pour les travailleurs du nucléaire (Cawley *et al.*, 1985 ; ICRP, 1979 ; Osborne, 1966).

Rapidement après la découverte du tritium par Rutherford en 1934, il a été mis en évidence que le type de molécule tritiée à laquelle les individus sont exposés (König, 1990 ; Smith, 1986), ainsi que la **forme isomérique** de ces molécules (Balonov *et al.*, 1993) et la position de l'**atome** de tritium (Balonov *et al.*, 1993 ; Katz *et al.*, 1965), a une incidence sur le métabolisme (Furuno-Fukushi *et al.*, 1987 ; Takeda, 1991) et donc les effets radiologiques et sanitaires.

Dans la synthèse bibliographique qui suit, les principales questions liées à la radioprotection du tritium seront passées en revue afin de mettre en évidence les lacunes actuelles.

# 1. Métrologie du tritium

La faible énergie du rayonnement du tritium ainsi que l'omniprésence et la très grande mobilité de l'hydrogène dans la biosphère rendent nécessaire un soin particulier pour la gestion des échantillons, depuis leur prélèvement jusqu'à l'interprétation des mesures.

## 1.1. Prélèvements et stockage des échantillons

Il n'y a pas à l'heure actuelle de procédure standard pour l'échantillonnage et la préparation d'échantillons tritiés (Boyer *et al.*, 2009b) bien que des comparaisons interlaboratoires aient mis en évidence des variations dues aux différences méthodologiques (Workman *et al.*, 2005). Un échantillon destiné à une mesure du tritium doit répondre aux critères usuels d'un échantillon destiné à des mesures physico-chimiques ou biologiques : il doit posséder les mêmes caractéristiques que le compartiment qu'on cherche à étudier afin d'être représentatif (Wood *et al.*, 1993). Le prélèvement doit ainsi permettre cette représentativité et le stockage garantir le maintien de ces caractéristiques jusqu'à la mesure.

### 1.1.1. Prélèvements

Le tritium étant **ubiquiste**, il est susceptible d'être présent dans la grande majorité des compartiments environnementaux, essentiellement sous forme d'eau.

#### 1.1.1.1 Prélèvements d'eau

##### 1.1.1.1.1 Eaux de surface

Pour être représentatifs, on considère que les prélèvements des eaux de surface doivent être faits à une profondeur limitant les perturbations liées aux interfaces (entre 50 cm au-dessus du fond et 50 cm sous la surface) et dans une zone de turbulence naturelle (au milieu du cours d'eau, en aval d'un pont) mais sans perturbation des conditions d'écoulement comme celles provoquées par un pilier de pont, une souche ou la berge (AFNOR, 2007, 2008).

Afin de limiter les influences extérieures, le préleveur est d'abord rincé à l'eau du lieu de prélèvement, puis le flacon dans lequel l'échantillon sera conditionné. Celui-ci est rempli au maximum afin de ne pas laisser d'air.

#### *1.1.1.1.2 Eaux souterraines*

L'eau d'une **résurgence** est prélevée aussi proche de la source que possible. Le flacon est préalablement rincé à l'eau du prélèvement puis rempli entièrement.

Le prélèvement dans un forage doit tenir compte des caractéristiques de celui-ci (notamment coupe technique et diamètre) afin d'adapter le matériel utilisé. Pour chaque prélèvement, le matériel et le flacon sont d'abord rincés avant que ce dernier ne soit rempli entièrement. Après chaque prélèvement, le matériel est rincé avec une eau de référence puis essuyé (ISO, 2009). Le prélèvement doit être fait dans des conditions limitant les perturbations, le rabattement (baisse localisée du niveau de la nappe due au pompage) et les apports exogènes dans le forage (AFNOR, 2009).

#### *1.1.1.1.3 Eaux de consommation*

Lorsque l'eau de consommation est prélevée à un point de consommation, le point de prélèvement doit être choisi pour éviter tout risque de pollution extérieure. De l'eau doit être tirée en quantité suffisante pour purger les canalisations avant le prélèvement (laisser couler l'eau 2 à 3 minutes) (IAEA, 1989 ; ISO, 2006).

#### *1.1.1.1.4 Eaux de pluie*

La localisation des collecteurs d'eau pluviale assure une absence d'obstacle naturel ou artificiel aux précipitations. Le volume des collecteurs est déterminé en fonction de la pluviométrie maximale enregistrée. Une grille à l'embouchure du collecteur permet de se prémunir des retombées de matière organique (feuilles) ou autre source de biais (AFNOR, 2001c). Afin de limiter les échanges entre l'eau prélevée dans les collecteurs et l'atmosphère, une fine couche d'huile minérale peut être introduite avant le prélèvement afin d'isoler l'eau pluviale de l'eau atmosphérique (Wood *et al.*, 1993).

#### 1.1.1.2 Prélèvements d'air

On peut distinguer trois types de prélèvements d'air en vue d'une mesure du tritium : ceux basés sur une eau faiblement tritiée qui se met, activement ou passivement, à l'équilibre avec l'eau atmosphérique, les pièges froids et ceux captant l'eau par des desséchants solides (Wood *et al.*, 1993).

##### 1.1.1.2.1 Les pièges à eau faiblement tritiée

On distingue deux types de prélèvements reposant sur l'eau faiblement tritiée : les préleveurs passifs et ceux actifs.

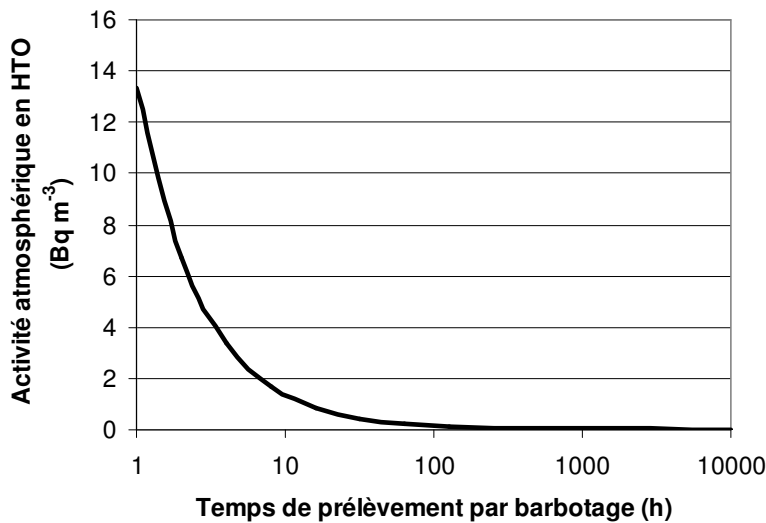
Les préleveurs passifs reposent simplement sur un échantillon d'eau faiblement tritiée (éventuellement mélangé à de l'éthylène glycol) disposé au lieu de prélèvement. L'eau du système se met passivement à l'équilibre avec l'eau atmosphérique ambiante (Davis, 1997 ; Wood et Workman, 1991). Cependant, dans les conditions environnementales où la concentration varie rapidement et où l'eau liquide aura tendance à s'évaporer, l'intérêt de ces systèmes paraît limité.

Le **barbotage** est actuellement la méthode de prélèvement du tritium dans l'air la plus utilisée. Le principe de cette méthode est de prélever à débit constant l'air ambiant et de le diffuser dans une eau initialement faiblement tritiée. Par affinité chimique, l'eau atmosphérique est piégée par l'eau liquide à travers laquelle l'air circule (Osborne, 1973). Désormais, les systèmes généralement employés permettent la mesure du tritium atmosphérique quelle que soit sa forme chimique : après avoir traversé 2 flacons remplis d'eau en série, l'air pompé circule à travers un four d'**oxydation catalytique** dans laquelle les autres espèces chimiques tritiées présentes dans l'atmosphère (essentiellement HT, plus rarement CH<sub>3</sub>T) sont oxydées en eau tritiée qui peut alors être piégée à son tour dans deux autres flacons remplis d'eau non-tritiée connectés en série. L'eau des flacons est maintenue à basse température (autour de 4°C) afin de limiter l'évaporation durant le prélèvement.

L'activité volumique de chaque flacon est alors mesurée et additionnée par série. En rapportant les deux activités en HTO et en gaz tritiés au volume d'air prélevé dans la période déterminée, on obtient l'activité tritium de l'atmosphère en HTO d'une part et dans les autres

formes d'autre part (HT ou autres formes organiques volatiles). Les premiers flacons de chaque série (les pots 1 et 3) piègent environ 90 % de l'eau qui les traverse.

Le principal inconvénient de cette méthode est la durée du prélèvement nécessaire en conditions environnementales. Dans les situations de surveillances de site, le **barbotage** se fait généralement sur une semaine, voire deux. Une mesure sur quelques heures ne peut se faire qu'avec des concentrations de l'air en tritium bien plus élevées (**Figure 1-2**).



**Figure 1-2 : Activité atmosphérique en HTO et temps de barbotage minimums théoriques pour atteindre le seuil de décision (2,4 Bq L<sup>-1</sup>) dans le premier pot de prélèvement (à une température de 20°C et à 60 % d'humidité relative, débit de prélèvement de 30 L h<sup>-1</sup>, 150 mL d'eau initialement dans le flacon)**

#### 1.1.1.2.2 Les pièges froids

Le principe de ce groupe d'outils consiste en la condensation et le piégeage de l'eau atmosphérique sur un point froid. Généralement la température de cet équipement est bien en dessous de 0°C afin d'optimiser le rendement du piège et de limiter les risques de ré-évaporation de l'eau une fois celle-ci condensée.

Dans les formes les plus simples, l'air circule passivement autour du point froid. Dans les outils plus élaborés, l'air est pompé à travers un échangeur qui constitue le point froid. Dans le premier cas, il est nécessaire de connaître l'hygrométrie moyenne de l'air au cours du prélèvement afin de pouvoir convertir l'activité volumique de l'eau condensée en activité tritium par volume d'air. Dans le second cas, comme pour **barbotage**, le volume d'air pompé

peut permettre de faire cette conversion (si on admet le rendement du piégeage proche de 100 %). Il est cependant préférable de connaître également l'hygrométrie de l'air pour améliorer la précision de la mesure.

Ces pièges peuvent être à l'origine de biais dans l'estimation de l'activité volumique de la vapeur de l'eau de l'air, du fait de l'enrichissement isotopique de la phase condensée.

#### 1.1.1.2.3 Les pièges secs

Ces systèmes de prélèvement d'eau atmosphériques emploient des desséchants solides (type silicagel) (Iida *et al.*, 1995 ; Patton *et al.*, 1997) ou des tamis moléculaires (Okai et Takashima, 1989 ; Uda *et al.*, 2006) pour extraire l'eau (ou d'autres gaz comme le dihydrogène et le méthane après les avoir oxydés) et la stocker le temps du prélèvement.

L'inconvénient de ces systèmes est qu'une **discrimination isotopique** apparaît lors de la désorption des pièges (généralement par chauffage) : l'eau extraite est appauvrie en tritium alors que la fraction adsorbée est enrichie. Lorsque la fraction adsorbée peut être estimée, des corrections peuvent être apportées (Rosson *et al.*, 2000).

#### 1.1.1.3 Prélèvements biologiques

L'étude du tritium dans des matrices complexes se heurte à la multiplicité des molécules dans lesquelles le tritium peut se trouver et à la capacité actuelle de séparer ces différentes espèces chimiques à des échelles permettant de mesurer l'activité tritium. Il reste de fait à améliorer la connaissance des activités et des transferts du tritium dans l'environnement et notamment le long de la chaîne alimentaire (Collège de l'ASN, 2010).

Pour ce faire, « *les plans d'échantillonnages dans les différents compartiments environnementaux doivent être incontestés et partagés. En particulier, le choix des espèces animales et végétales à mesurer doit être revu afin de lever tout biais d'espèce.* » (Collège de l'ASN, 2010). La localisation de l'échantillon est indispensable pour interpréter les résultats et pour effectuer les prélèvements ultérieurs. L'utilisation de cartes géographiques et/ou d'équipements de positionnement est donc impérative. Les prélèvements doivent être



représentatifs de l'espèce et de la localisation déterminée en évitant par exemple les bordures de parcelles ou les autres conditions particulières (AFNOR, 2001c, b, a). Les prélèvements doivent être adaptés aux mesures prévues (notamment de masse suffisante pour les différentes mesures prévues) (IAEA, 1989).

Les flacons et le matériel de prélèvements doivent préserver l'échantillon de pertes par absorption sur les parois, évaporation, et échanges (particulièrement sensibles pour les analyses du tritium) ainsi que de la contamination par des éléments extérieurs de l'environnement ou du conteneur (AFNOR, 2001a)

En cas de prélèvement répété, il est nécessaire d'effectuer les prélèvements au sein d'une zone homogène afin de limiter l'effet de variabilité spatiale. Le prélèvement ne se fait pas pendant ou immédiatement après une période de précipitation ou de rosée. Les parties aériennes sont prélevées au moins 2 cm au dessus du sol. (AFNOR, 2000).

Le lait doit être prélevé aussi tôt que possible après la traite pour limiter les risques de contamination par l'environnement (IAEA, 1989)

Afin de garantir la conservation de l'échantillon, il est conseillé de rapidement procéder à la **lyophilisation** ou à l'**étuvage** des échantillons pour la préparation de la matière sèche. Le rapport masse sèche sur masse fraîche est calculé (AFNOR, 2000).

### 1.1.2. Stockage des échantillons

Les échantillons dont l'activité tritium doit être mesurée sont conditionnés dans des flacons étanches, ne pouvant pas induire de contamination, ne pouvant pas absorber une partie de l'échantillon ou réagir avec certains de ses composés. Le contenant doit être hermétiquement fermé pour éviter toute contamination de l'ambiance extérieure. Si l'échantillon ne peut pas être traité rapidement, il doit être placé au réfrigérateur ou au congélateur pour limiter les risques de dégradation de l'échantillon (AFNOR, 2001a). Dans ce cas, le flacon doit être adapté aux températures négatives (être en polyéthylène par exemple) (IAEA, 1989). Le transport entre les lieux de prélèvement et de stockage ou traitement doit se faire dans les meilleurs délais (AFNOR, 2001a). Il est préférable de remplir au maximum le contenant pour

limiter les échanges entre l'échantillon et l'air du flacon durant le stockage . Il faut noter que le tritium est connu pour diffuser à travers les parois des flacons et des autres conteneurs (Okada et Momoshima, 1993). Il est donc conseillé de doubler le flaconnage, par exemple en insérant le flacon de prélèvement dans une pochette vinyle doublement soudée (Pointurier *et al.*, 2002).

## 1.2. Méthodes de mesures du tritium

On distingue différentes stratégies de mesures du tritium :

- par la différence de masse avec le **protium** : AMS (Dogaru *et al.*, 2011 ; Stan-Sion *et al.*, 2009)
- par microcalorimétrie (Gatti, 2001)
- par la différence dans l'absorption des infrarouges (Genty et Reversat, 1973)
- par la mesure des **rayonnements  $\beta^-$**  émis lors de la désintégration du tritium comme dans les chambres d'**ionisation** (Osborne et Coveart, 1977)
- par la mesure de la quantité de  $^3\text{He}$  produit par la désintégration du tritium.

On ne développera ici que les deux seules méthodes qui sont actuellement les plus employées dans les mesures du tritium en conditions environnementales : la scintillation liquide et la **spectrométrie** de masse  $^3\text{He}$ . Les autres méthodes sont généralement pénalisées par une limite de détection bien supérieure aux activités environnementales.

### 1.2.1. Scintillation liquide

Le principe de la mesure par scintillation liquide est de convertir les rayonnements émis lors de la décroissance de l'élément mesuré (un électron dans le cas du tritium) en photons détectables et quantifiables.

La nature de la solution à mesurer est déterminante dans le rendement de la mesure. Pour des mesures de faibles activités, le rendement optimal est obtenu sur une eau pure. En fonction de la nature initiale de l'échantillon, des prétraitements peuvent être ainsi nécessaires pour

atteindre cet objectif notamment si les impuretés risquent d'induire un affaiblissement lumineux trop important (AFNOR, 2011) ou au contraire des signaux parasites (thermo-, électro- ou chimiluminescence) (Guétat *et al.*, 2008). La purification est généralement opérée par distillation mais la filtration fine donne également de bons résultats (Sakuma *et al.*, 2003 ; Tarancón *et al.*, 2010). La préparation doit être faite aussi tôt que possible après le prélèvement (AFNOR, 2004, 2011).

L'échantillon est mélangé intimement avec le liquide scintillant. Celui-ci est un mélange d'un solvant (voire également d'un solvant secondaire en fonction de la nature de l'échantillon), d'un scintillateur et d'autres additifs. Le solvant primaire est essentiellement le support des scintillateurs. Ses caractéristiques doivent donc permettre le transfert maximum de l'énergie qu'elle soit celle du rayonnement initial ou des photons produits par les scintillateurs. Ce sont généralement des solvants organiques aromatiques.

Un **blanc** est réalisé avec une eau dont l'activité est aussi basse que possible dans les mêmes conditions que le(s) échantillon(s) à mesurer : même type de flacon de comptage, même géométrie de remplissage, mêmes proportions entre la prise d'essai et le cocktail scintillant, stabilité de température du matériel de détection et valeur de l'indicateur d'affaiblissement lumineux incluse dans la courbe d'étalonnage. L'activité mesurée sur ce **blanc** est déduite de l'activité mesurée sur l'échantillon (AFNOR, 2011).

Dans les conditions optimales de mises en œuvre, la limite de détection peut atteindre 1 Bq L<sup>-1</sup> (Pointurier *et al.*, 2003). Cependant, pour un comptage de 200 minutes dans un **tricarbotrimètre** type PerkinElmer Tri-Carb 2910 TR, une limite de détection à 5,6 Bq L<sup>-1</sup> est raisonnable.

Pour améliorer la capacité de quantification du tritium par scintillation liquide dans les échantillons de très faible activité, il peut être procédé à un enrichissement électrolytique en amont de la scintillation liquide. Lors de cette opération, l'**électrolyse** de H<sub>2</sub>O à la cathode est plus efficace que celle du HTO. Il en découle une concentration progressive du HTO dans l'eau électrolysée (Bogen *et al.*, 1973). Un gain d'un facteur 10 à 15 peut être atteint par **électrolyse** (Plastino *et al.*, 2007), permettant même un enrichissement d'un facteur 100 en

procédant à deux étapes d'**électrolyses** successives (Baglan et Ansoborlo, 2010) mais nécessite alors de grandes quantités d'échantillons (Wood *et al.*, 1993).

### 1.2.2. Spectrométrie de masse $^3\text{He}$

Le principe de la mesure par **spectrométrie**  $^3\text{He}$  est simple : un échantillon est conditionné dans une enceinte « tirée » au vide (pour notamment le dégazer), scellée puis stockée durant une période suffisante (en fonction de la masse de l'échantillon et de son activité tritium) avant d'être connectée à un **spectromètre de masse** pour mesurer la quantité de  $^3\text{He}$  produite lors de la décroissance du tritium durant le stockage (Jean-Baptiste *et al.*, 2010).

L'activité tritium de l'échantillon peut alors être déduite :

$$A_T = \frac{\lambda N(^3\text{He})_T}{m(1 - e^{-\lambda t})} \quad (1)$$

avec :

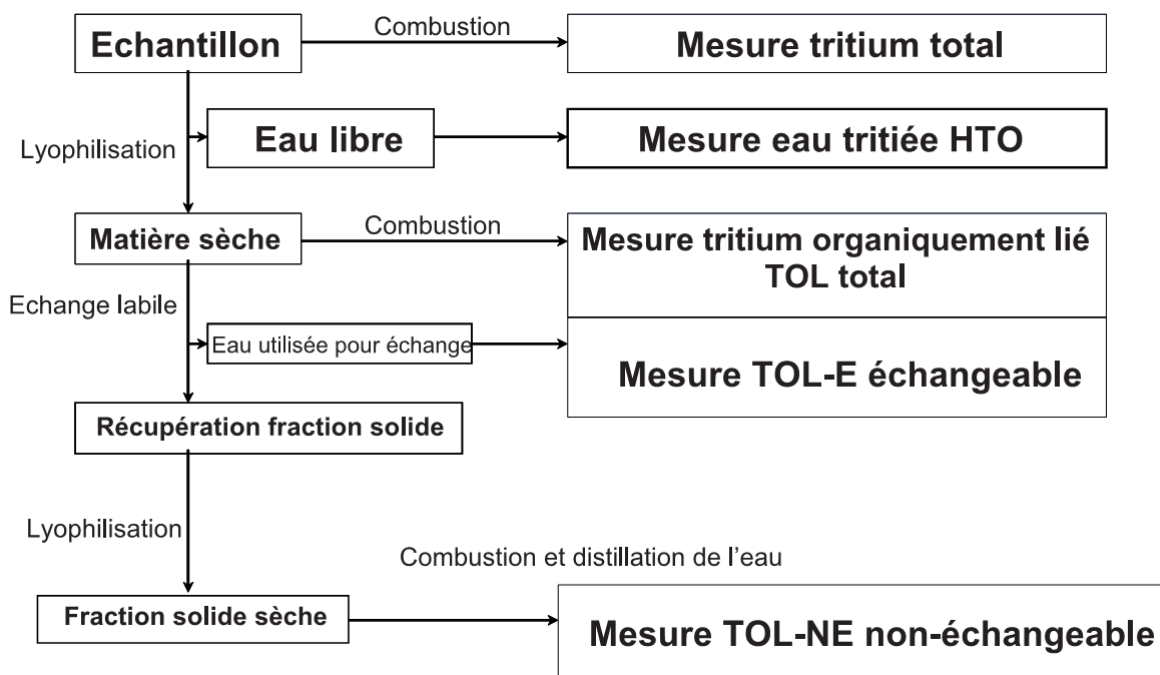
- $A_T$  l'activité massique de l'échantillon (en  $\text{Bq kg}^{-1}$ )
- $(^3\text{He})_T$  est la quantité de  $^3\text{He}$  produit lors de la décroissance du tritium (en mol)
- $m$  est la masse de l'échantillon (en kg)
- $\lambda$  est la constante radioactive du tritium
- $t$  le temps de stockage.

Cette technique permet de mesurer de très faibles niveaux d'activité : pour un échantillon de 20 g stocké 3 mois, limite de détection généralement atteinte par l'équipe du LSCE (CEA Saclay) est de  $0,15 \text{ Bq kg}^{-1}$  (Jean-Baptiste *et al.*, 2010). Cependant, en augmentant la masse d'échantillon stocké et/ou le temps de stockage, cette limite peut être encore diminuée :  $0,35 \text{ mBq L}^{-1}$  dans (Wood *et al.*, 1993),  $0,01 \text{ Bq L}^{-1}$  dans (Belot *et al.*, 1996).

### 1.3. La mesure du tritium dans des matrices complexes

Les matrices biologiques sont complexes du point de vue de la mesure du tritium. En effet, elles sont généralement composées d'eau et d'une multitude de molécules hydrogénées (organiques ou minérales) susceptibles d'être également tritiées. Les techniques mises en œuvre pour discriminer ces différentes formes doivent être pertinentes par rapport à l'objectif de la mesure : du contrôle de routine ? du suivi environnemental ? de la recherche fondamentale ?

Actuellement, que ce soit dans les suivis environnementaux ou les expériences en conditions contrôlées, l'analyse du tritium dans les matrices biologiques, particulièrement lorsque la mesure du tritium se fait par scintillation liquide, suit une logique présentée **Figure 1-3** (Baglan *et al.*, 2010).



**Figure 1-3 : Schéma d'analyse du tritium dans les échantillons de l'environnement**  
(Baglan *et al.*, 2010)

### 1.3.1. L'oxydation

En règle générale, la mesure du tritium pour les échantillons qui ne sont pas des **solutions aqueuses** passe par leur **oxydation** complète en eau afin de pouvoir recourir à la scintillation liquide dans des conditions satisfaisantes. Cette **oxydation** se fait soit par une combustion plus ou moins rapide de l'échantillon dans de l'O<sub>2</sub> pur, soit par **oxydation** acide.

La plupart des échantillons environnementaux sont oxydés par combustion dans de l'oxygène pur en excès. Ainsi, toute l'eau produite lors de la réaction provient exclusivement de l'**oxydation** de l'hydrogène de l'échantillon, quelle que fût sa forme d'origine. Deux types de système sont employés actuellement :

- les systèmes sous pression (type bombe Parr) (Kim *et al.*, 2013 ; Workman *et al.*, 2005) : l'échantillon est inséré dans une enceinte qui est hermétiquement fermée, tirée au vide puis remplie d'O<sub>2</sub> pur. L'échantillon est alors brûlé en conditions de surpression. L'eau est soit évacuée de l'enceinte et récupérée dans un piège froid soit directement condensée dans l'enceinte.
- Les systèmes sous flux d'O<sub>2</sub> (ou de mélange O<sub>2</sub>-Ar) (Baglan *et al.*, 2005 ; Cossonnet *et al.*, 2009 ; Pointurier *et al.*, 2002 ; Pointurier *et al.*, 2004) : l'échantillon est inséré dans une enceinte fermée à l'une de ses extrémités et prolongée à l'autre par un piège froid. Le système est balayé en permanence par un flux d'O<sub>2</sub> en excès (ou de mélange O<sub>2</sub>-Ar). Une ou deux unités chauffantes (fours tubulaires) permettent d'atteindre les températures nécessaires à une complète **oxydation** de l'échantillon. La partie du tube proche de l'exutoire des gaz peut être remplie d'un **catalyseur** (comme de l'oxyde de cobalt) afin de parfaire l'**oxydation**. Les gaz produits dans le tube passent dans un piège froid dans lequel l'eau se condense. Les autres gaz s'échappent.

Des **oxydations** « humides » sont employées de façon anecdotique : en fonction de la nature de l'échantillon, un ou plusieurs traitements sont appliqués afin d'aboutir à une **oxydation** de l'échantillon aussi complète que possible (Bogen *et al.*, 1973 ; Commerford et Carsten, 1977 ; Environment Agency, 2005).

Quel que soit le mode d'**oxydation** utilisé, les eaux obtenues doivent généralement être neutralisées (ajout de peroxyde de sodium et/ou permanganate de potassium) et purifiées (généralement par distillation) avant la mesure par scintillation liquide (Hisamatsu *et al.*, 1990 ; Wood *et al.*, 1993).

### 1.3.2. L'extraction d'eau

Plusieurs étapes présentées dans la **Figure 1-3** nécessitent la séparation de l'eau et de la matière sèche. Pour ce faire, au moins une des techniques suivantes est employée :

- La filtration : elle permet de séparer rapidement et facilement une part importante de la matière sèche, sauf la fraction soluble qui passe dans le filtrat. Le biais induit dépend des modalités de la filtration (seuil de coupure du filtre utilisé) et de la nature de l'échantillon traité (Bacchetta *et al.*, 2012). Le retentat et le filtrat nécessitent donc un traitement complémentaire.
- La distillation : elle peut être mise en œuvre à pression atmosphérique ou sous pression réduite. Sous pression réduite, il est alors possible de procéder à la distillation à des températures plus basses qu'à pression atmosphérique. Cela permet ainsi de limiter le risque de dégradation des molécules organiques et donc de contamination de l'eau distillée par des produits pyrolytiques (Wood *et al.*, 1993).
- la distillation azéotropique permet l'extraction complète de l'eau libre des échantillons à des températures plus basses que la distillation (Baumgärtner et Donhaerl, 2004 ; Baumgärtner et Kim, 1990 ; Baumgärtner et Kim, 2000 ; Baumgärtner *et al.*, 2009 ; Kim *et al.*, 2008 ; Moghissi *et al.*, 1973 ; Wood *et al.*, 1993). Cependant, du fait de la mise en œuvre de composés organiques, cette technique présente un risque de contamination de la matière sèche par les produits utilisés.
- La cryodessiccation ou **lyophilisation** consiste en l'extraction de l'eau d'une matrice par **sublimation** (AFNOR, 1997 ; Diabaté et Strack, 1997 ; Kim et Baumgärtner, 1991 ; Wood *et al.*, 1993). Cette technique présente les mêmes avantages que la distillation sous pression réduite mais permet de déshydrater efficacement à peu près toutes les matrices biologiques.

## 2. Echange labile

Dans la matière sèche, l'hydrogène (et donc le tritium) peut être lié à des **atomes** de carbone ou à des **hétéroatomes** (essentiellement azote, oxygène ou soufre). Dans le premier cas, on considère que la liaison est stable et qu'elle perdurera jusqu'à l'**anabolisme** de la molécule. Dans le deuxième cas, on parle d'hydrogène labile car celui-ci se met en équilibre isotopique avec les autres hydrogènes labiles de son environnement proche. La **labilité** de ces hydrogènes a été mise en évidence très tôt après la découverte du tritium (Hamill, 1937 ; Hamill et Freudenberg, 1935). Lorsque du tritium est lié à des hétéroatomes, on parle de Tritium Organiquement Lié échangeable (**TOLe**) ou *exchangeable Organically Bound Tritium* (eOBT). Lorsque du tritium est lié à un **atome** de carbone, on parle alors de Tritium Organiquement Lié non-échangeable (**TOLne**) ou *non-exchangeable Organically Bound Tritium* (neOBT)

Compte tenu de la labilité du tritium lorsqu'il est lié à un **hétéroatome**, il semble nécessaire de le distinguer des tritiums non-échangeables qui peuvent perdurer longtemps dans la biomolécule à laquelle ils sont liés. Lors de l'analyse, on procède à un **échange labile** pour opérer cette distinction. Le principe est simple : mettre en contact la matière sèche de la matricé étudiée avec une quantité d'eau non tritiée suffisante pour que, par la mise en équilibre entre l'eau non tritiée et le **TOLe**, il y ait dilution du **TOLe** et que celui-ci soit négligeable devant le **TOLne**.

Deux techniques sont généralement utilisées. Dans la première, on fait traverser la matière sèche finement pulvérisée par un flux de vapeur d'eau non-tritiée. L'eau est récupérée dans un piège froid après son passage dans la matière sèche et son activité volumique peut être mesurée. L'opération est arrêtée lorsque celle-ci est suffisamment basse (Guénot et Belot, 1984 ; Sauer *et al.*, 2009 ; Schimmelmänn, 1991). L'autre méthode consiste en le mélange de la matière sèche finement pulvérisée avec de l'eau non-tritiée en quantité suffisante (généralement 10 fois la masse de l'échantillon sec). L'ensemble est maintenu en contact de 24 h à 72 h puis l'eau est extraite du mélange (Baglan *et al.*, 2008 ; Baumgärtner *et al.*, 2009 ; Kim et Korolevych, 2013). Cette opération peut être répétée si besoin.



Comme la deuxième méthode est plus rapide que la première (échange + **lyophilisation** : 5 à 7 jours contre plus de 3 semaines pour la première méthode), elle est généralement préférée (Kim *et al.*, 2008 ; Pointurier *et al.*, 2004).

Cependant, il a été mis en évidence qu'une partie de l'hydrogène labile ne se mettait pas en équilibre avec l'eau d'échange quelle que soit la méthode employée (Baumgärtner et Donhaerl, 2004 ; Baumgärtner *et al.*, 2009). Cela est attribué au fait que les grosses biomolécules, notamment la cellulose, l'**ADN** ou les grosses protéines, sont susceptibles d'avoir des conformations tertiaires et/ou quaternaires dans lesquelles une partie de leur hydrogène labile est inaccessible à l'échange. Cette fraction est qualifiée de *buried tritium* (que nous traduirons ici par **tritium enfoui**). Ce mécanisme perturbe donc la mesure du **TOLne** et donc du **TOLe** (Collège de l'ASN, 2010).

Pour contourner ce problème, certains auteurs ne mesurent que le **TOLt** (Tritium Organiquement Lié total ou **tOBT** pour *total Organically Bound Tritium*) et le **TFWT**<sup>1</sup> (pour *Tissue Free Water Tritium*, le tritium dans l'eau libre de la matrice considérée) et déduisent le **TOLne** de la fraction labile d'hydrogène de la matrice considérée (généralement entre 15 % et 50 % de l'hydrogène de la matière sèche) et du **TFWT**, en considérant ainsi que l'équilibre isotopique est parfait entre le **TFWT** et le **TOLe** (Jean-Baptiste *et al.*, 2010) :

$$A_{\text{TOLne}} = A_{\text{TOLt}} - \%_{\text{He}} (A_{\text{TFWT}}) \quad (2)$$

avec :

- $A_{\text{TOLne}}$  l'activité volumique de l'eau de combustion du **TOLne** (en Bq L<sup>-1</sup>)
- $A_{\text{TOLt}}$  l'activité volumique de l'eau de combustion du **TOLt** (en Bq L<sup>-1</sup>)
- $\%_{\text{He}}$  la fraction labile de l'hydrogène de la matrice (sans unité)
- $A_{\text{TFWT}}$  l'activité volumique de l'eau libre de la matrice (en Bq L<sup>-1</sup>)

---

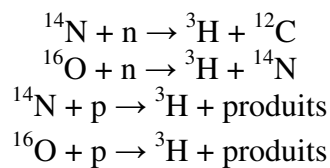
<sup>1</sup> Le terme TFWT n'est pas pertinent si on en fait la traduction littérale (puisque'il néglige l'eau contenue dans les vaisseaux des plantes par exemple). Dans ce mémoire, TFWT est utilisé pour dénommer la totalité de l'eau native de la matrice utilisée, comprenant ainsi l'eau libre et l'eau liée.

## 3. Le tritium dans l'environnement

### 3.1. Émissions de tritium dans l'environnement

#### 3.1.1. Les sources naturelles

L'essentiel de la production naturelle de tritium se fait dans la haute atmosphère (entre 10 et 30 km d'altitude). À ce niveau, les rayonnements cosmiques (protons et neutrons) réagissent avec les **atomes** d'azote 14 et d'oxygène 16 (Hill et Johnson, 1993). Du fait de ces interactions, le tritium naturel est dit cosmogénique.



(Okada et Momoshima, 1993)

Les noyaux de tritium produits en haute atmosphère réagissent surtout avec les **atomes** d'hydrogène pour former des molécules d'hydrogène tritié (Balonov *et al.*, 1974 ; Belot *et al.*, 1996). À plus basse altitude, ils sont principalement incorporés par les molécules d'eau et forment alors de l'eau tritiée (**HTO**) qui se mélange avec les eaux atmosphériques et celles de surface (Hill et Johnson, 1993).

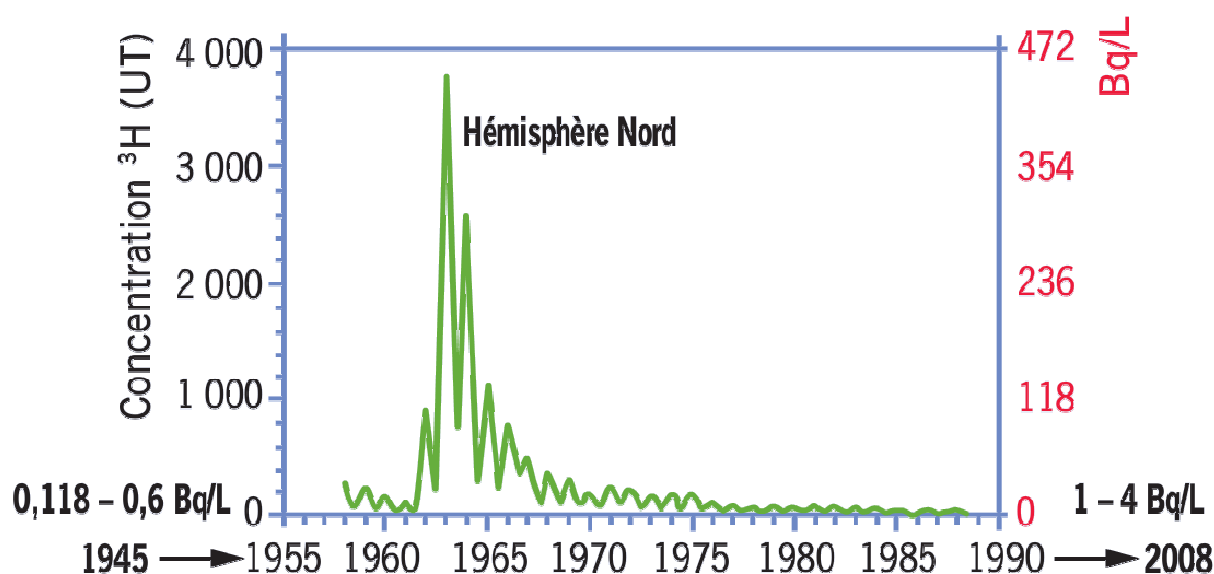
La production naturelle de tritium est évaluée à 200 g an<sup>-1</sup> (Elwood, 1971 ; UNSCEAR, 1977).

Du tritium est également produit dans la croûte terrestre par l'action de neutrons sur du lithium (<sup>6</sup>Li). Cependant cette voie de production du tritium semble anecdotique par comparaison avec la source atmosphérique (Okada et Momoshima, 1993).

On estime le stock naturel de tritium à 3,5 kg de tritium.

### 3.1.2. Les sources anthropiques

La principale origine du tritium anthropique est la **rémanence** des essais nucléaires atmosphériques qui ont eu lieu essentiellement entre 1952 à 1963 (**Figure 1-4**) où près de 650 kg de tritium ont été émis dans l'atmosphère (Belot *et al.*, 1996). On estime qu'il reste environ 28 kg de ce tritium en 2013 (Guétat, 2007), essentiellement sous forme d'eau ou de **TOLne**, lorsqu'il a été incorporé dans les cernes d'arbres.



**Figure 1-4** Evolution de la teneur en tritium dans l'eau de pluie de 1958 à 1990 exprimée en Unité Tritium (UT) et en Bq/L (IRSN, 2009)

Les gammes d'activités correspondant d'une part au bruit de fond naturel cosmogénique antérieur aux essais nucléaires, d'autre part au niveau actuel ont été ajoutée à la courbe de l'AIEA (Gat *et al.*, 2008)

Actuellement, les principales sources anthropiques de tritium (UNSCEAR, 2008) sont les usines de traitement du combustible nucléaire (en 2002, 42,6 g<sup>2</sup> en rejets liquides) et les réacteurs (en 2002, 1,9 g de tritium dont le tiers émis dans l'atmosphère) (**Figure 1-5**).

<sup>2</sup> L'activité massique du tritium est 3,59 10<sup>14</sup> Bq g<sup>-1</sup> Hubert F. (2010). Caractéristiques et mesure du tritium. In: Le Tritium - Actualité d'aujourd'hui et de demain. Gazal S., Amiard J. C. eds., Tec&Doc, Paris, pp. 1-6..

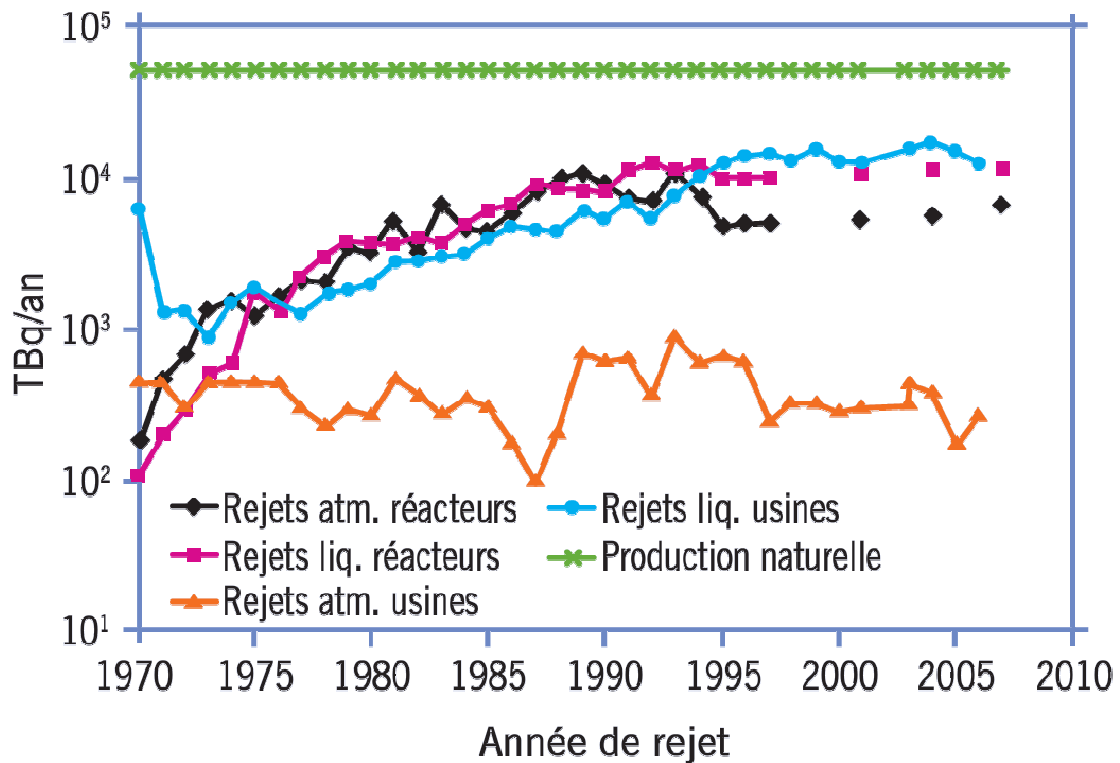


Figure 1-5 Comparaison des rejets annuels en tritium de l'industrie nucléaire civile et de la production annuelle de tritium naturel (UNSCEAR)(March et Besnus, 2010)

Les émissions de tritium par l'industrie des armes thermonucléaires sont difficilement quantifiables au niveau mondial. En France, elles ont représentés moins de 2 g de tritium émis dans l'environnement en 2012 (CEA, 2013). La production de molécules tritiées (pour la recherche ou la médecine) et la production de produits luminescents (comme les aiguilles de montre) représentent environ  $0,3 \text{ g an}^{-1}$  de tritium émis selon (CCSN, 2009). Ce sont donc des sources secondaires par rapport aux activités liées à la production énergétique.

Le futur réacteur expérimental de fusions thermonucléaire **ITER** utilisera environ 1 kg de tritium par an. Les rejets, principalement atmosphériques, devraient être limités à quelques grammes (Cortès *et al.*, 2009 ; Rodriguez-Rodrigo, 2008). Le Laser MégaJoule, ainsi que les autres lasers de puissance destinés à la fusion par confinement inertiel, devraient rejeter de l'ordre de quelques milligrammes de tritium par an (Guétat *et al.*, 2008 ; March et Besnus, 2010).

## 3.2. Transformation du HT en eau

### L'importance des micro-organismes du sol

Étant peu biodisponible (Pinson, 1951) et peu soluble dans l'eau (Belot, 1986), le dihydrogène tritié (HT) induit un impact radiologique par inhalation 25 000 fois inférieur à l'eau tritiée (Galeriu *et al.*, 2008).

Le dihydrogène tritié est relativement inerte chimiquement : sa **demi-vie** dans l'atmosphère est de 10 ans (Okada et Momoshima, 1993). Il pénètre le sol essentiellement par diffusion : on parle de dépôts secs. Il n'y a d'ailleurs pas de dépôt humide de HT (Galeriu *et al.*, 2008). La vitesse et la profondeur de cette diffusion dépendent essentiellement des gradients de concentration ainsi que des caractéristiques des surfaces concernées.

Une fois dans le sol, le dihydrogène tritié est rapidement oxydé par l'action de microorganismes (essentiellement bactéries mais également des microorganismes protozoaires ou des mousses) (McFarlane *et al.*, 1978). Cette **oxydation** se fait dans les tout premiers centimètres : la profondeur type de pénétration du HT dans le sol est estimée à 2,5 cm (Garland et Cox, 1980 ; Sweet et Murphy, 1981). L'**HTO** produit rejoint alors le cycle de l'eau et est réémis dans l'atmosphère ou circule dans le sol (Hopkins, 1995).

Dans le sol, le tritium peut être intégré dans les composants organiques. Des expériences menées en 2005 ont conclu à une discrimination positive du tritium par rapport à l'hydrogène dans l'incorporation des **acides humiques** et **fulviques** (de 1,3 à 1,7) certainement liée au grand nombre de liaisons hydrogènes dans ces composés (Wierczinski *et al.*, 2005). Cependant, en fonction des conditions météorologiques et des caractéristiques du sol, l'**HTO** peut s'évaporer et rejoindre ainsi l'eau atmosphérique. L'eau tritiée peut également migrer vers la profondeur du sol, selon des mécanismes d'**advection** et de diffusion. L'eau tritiée circule dans le sol suivant la gravité, la capillarité (qui est fonction de la nature du sol et de son état) et les gradients de concentration (Murphy, 1993). Elle peut alors être absorbée par le système racinaire des plantes (Täschner *et al.*, 1995) ou rejoindre une nappe, circulante ou non.

La **demi-vie** du tritium dans le sol sous forme HT et **HTO** est de quelques jours (entre 1 et 5 jours) et varie selon la saison et serait plus courte en été (Belot, 1986 ; Kirchmann *et al.*, 1971 ; Koranda et Martin, 1972). Sous forme organique (intégré dans l'humus par l'action de la flore pédologique ou produit de la décomposition de la matière organique tritiée tombée au sol), la **demi-vie** peut atteindre 5 jours avant d'être oxydée en **HTO** (Diabaté et Strack, 1993).

Des expériences ont également montré que la surface foliaire pouvait également être le siège de l'**oxydation** du HT en **HTO** (Belot, 1986 ; Cline, 1953 ; Ichimasa *et al.*, 1989). Cette voie d'**oxydation** apparaît cependant secondaire devant l'**oxydation** dans le sol.

### **3.3. De l'eau à la matière organique : le rôle primordial des végétaux**

#### **3.3.1. Origines racinaire et atmosphérique de l'eau libre des plantes**

Les végétaux sont essentiellement constitués d'eau : de 60 à 95 % de leur masse en moyenne (Boyer *et al.*, 2009b). Ce chiffre varie beaucoup en fonction notamment de l'espèce (McFarlane *et al.*, 1979) et de l'organe considéré (IAEA, 2007). L'eau est d'abord le solvant dans lesquels se déroulent les réactions biochimiques. L'eau joue également un rôle dans la circulation des minéraux et des composés organiques, dans la régulation énergétique, dans de nombreuses réactions du métabolisme et même dans la structure et le port érigé des végétaux (Hopkins, 1995).

Le flux d'eau traversant les plantes terrestres provient essentiellement du sol et est prélevé par le système racinaire puis diffusé par le système vasculaire (Murphy, 1993). On pourrait en déduire que la teneur en eau libre tritiée de la plante (Tissue Free Water Tritium ou **TFWT**) est uniquement liée à la teneur en eau tritiée du sol (Elwood, 1971). Il a été pourtant montré qu'une exposition à de l'eau tritiée atmosphérique par voie foliaire conduisait à une mise en équilibre rapide de l'eau tissulaire avec la vapeur d'eau de l'air. Ces échanges d'eau se font à 90 % par diffusion par les **stomates** (pores de l'épiderme des feuilles) (NCRP, 1979) et par la cuticule des feuilles (Campbell, 1995 ; McFarlane *et al.*, 1979). Il est donc pertinent de

considérer que le sol, l'atmosphère et les plantes constituent un continuum en ce qui concerne l'eau (Koranda et Martin, 1972 ; Raney et Vaadia, 1965) et que l'activité de l'eau libre des végétaux est la résultante des échanges rapides entre ces compartiments.

Cet équilibre dépend des conditions environnementales (température, hygrométrie, illumination, ...) mais également de caractères spécifiques à la plante (espèce/variété, stade de développement, profondeur racinaire, ...) et de processus majeurs (**photosynthèse**, métabolisme nocturne, respiration, transpiration, etc.) (Belot, 1986 ; Diabaté et Strack, 1997 ; Galeriu *et al.*, 2008 ; Leaney *et al.*, 1985 ; McFarlane *et al.*, 1979 ; Murphy, 1993 ; Spencer, 1984). Par exemple, dans les situations où l'hygrométrie relative de l'atmosphère est proche de 100 %, l'**évapotranspiration** étant quasi-nulle, l'absorption racinaire est limitée et l'origine foliaire de l'eau libre de la plante devient alors prépondérante (Boyer *et al.*, 2009b). De ces variations découlent des estimations des contributions relatives de l'eau du sol et de l'eau atmosphérique à l'eau libre de la plante très différentes en fonction des auteurs : d'une majeure partie liée à l'eau du sol (McFarlane, 1976) à une contribution de l'eau atmosphérique 4 fois supérieure à celle de l'eau du sol (Raskob, 1995).

Plusieurs mécanismes permettent d'expliquer la contribution sensible de l'eau atmosphérique à l'eau libre de la plante, mais également son importance dans la **photosynthèse**. Tout d'abord, la mise en équilibre isotopique des compartiments d'eau de la plante et de l'atmosphère induit des flux de tritium dans le sens du gradient de concentration, que ce soit par le transfert physique de molécules d'eau, même à contre-courant du flux d'eau physiologique ou par la mise en équilibre de proche en proche des hydrogènes labiles avec l'eau atmosphériques.

La **demi-vie** biologique de l'**HTO** dans les plantes herbacées étant de l'ordre de plusieurs dizaines de minutes (20-30 minutes pour le tournesol, 55 minutes pour l'avoine) (Koranda et Martin, 1972), la teneur en **HTO** dans un échantillon reflète donc les conditions environnementales quelques heures avant son prélèvement (Davis *et al.*, 2005). Certains auteurs font mention de deux voire trois composantes temporelles dans la **demi-vie** biologique du **TFWT** : la première, décrite ci-dessus, constituerait 99% de l'eau libre (Belot, 1986 ; Brudenell *et al.*, 1997 ; McFarlane *et al.*, 1979). La deuxième composante a une durée de quelques heures : 17 h chez *Medicago hispida* (Koranda et Martin, 1972),

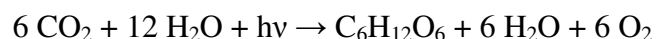
15-30 h chez le chou (Brudenell *et al.*, 1997) et environ 30 h dans la pomme de terre ou le raisin (Belot, 1986). Ce compartiment (environ 1% de l'eau libre de la plante) correspondrait à de l'eau tritiée ou à des fractions du tritium échangeable moins accessibles (Choi *et al.*, 2002 ; Cline, 1953). La troisième composante (dont la **demi-vie** est de plusieurs centaines d'heures) est très proche de celle du tritium organiquement lié et pourrait ainsi être issue de l'**anabolisme** de molécules organiques.

Une fois dans la plante, l'eau tritiée participe aux différents rôles de l'eau dans la plante jusqu'à être **évapotranspirée** ou jusqu'à ce qu'elle participe à la **photosynthèse**. Du tritium est alors susceptible d'être lié à de la matière organique (Koranda et Martin, 1972).

La vapeur d'eau provenant de l'**évapotranspiration** par la plante ainsi que de l'évaporation de l'eau du sol peut constituer des conditions particulières en termes d'humidité et de concentration en HTO (Amano *et al.*, 1995 ; Belot *et al.*, 1988 ; Okada et Momoshima, 1993 ; Täschner et Bunnenberg, 1997 ; Yokoyama *et al.*, 2004). Les conditions nécessaires pour que son effet soit sensible dans le métabolisme de la plante en conditions environnementales sont très ténues et assez exceptionnelles (notamment absence de vent). On peut donc généralement considérer ce mécanisme comme négligeable en situation d'exposition chronique.

### 3.3.2. Les métabolismes des végétaux et la matière organique tritiée

Les végétaux sont des organismes **autotrophes**, c'est-à-dire capables de produire leur matière organique à partir de matière minérale. Par la **photosynthèse**, ils produisent des sucres simples à partir du dioxyde de carbone et de l'eau en utilisant l'énergie lumineuse fournie par le rayonnement solaire :

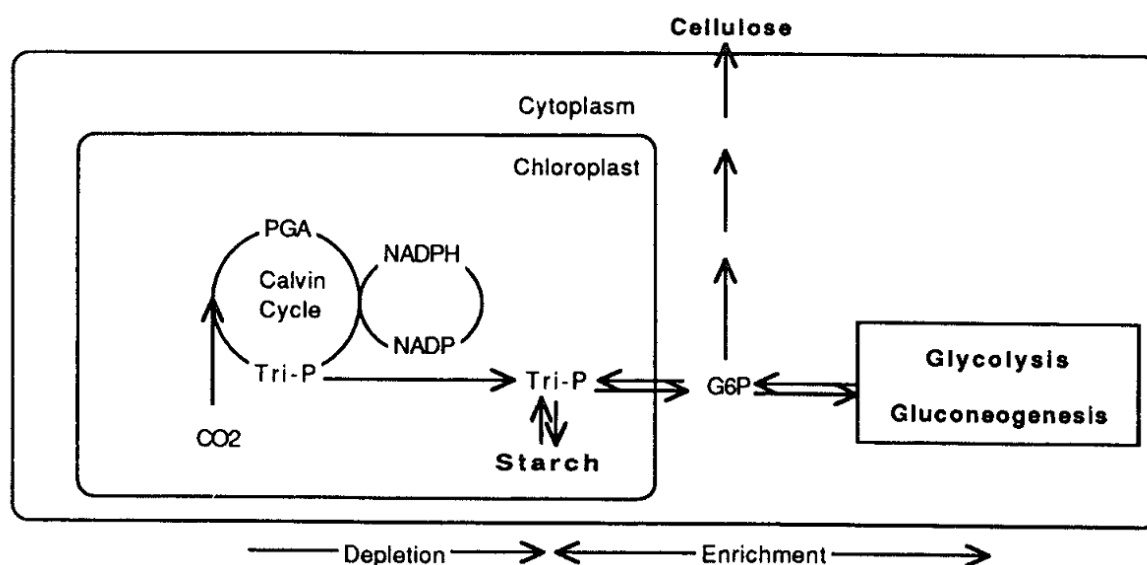


En présence d'eau tritiée, les végétaux synthétisent des sucres tritiés qui sont utilisés comme sources d'énergie ou comme brique élémentaire pour la synthèse d'autres molécules organiques (amidon, cellulose, lipides et protéines notamment). Ainsi, l'ensemble de leurs molécules organiques est susceptible d'être tritié. Le devenir des **atomes** de tritium et leur **cinétique** dans les organismes dépendent du devenir des molécules les portant et du caractère



fort ou faible de leur liaison avec les autres **atomes** (Diabaté et Strack, 1993) : le **TOLe** qui se met perpétuellement en équilibre isotopique avec les **atomes** d'hydrogène labiles (notamment de l'eau libre de la plante) et le **TOLne**, incorporé lors de la **photosynthèse** et des synthèses ultérieures, qui perdure jusqu'au **catabolisme** des molécules tritiées.

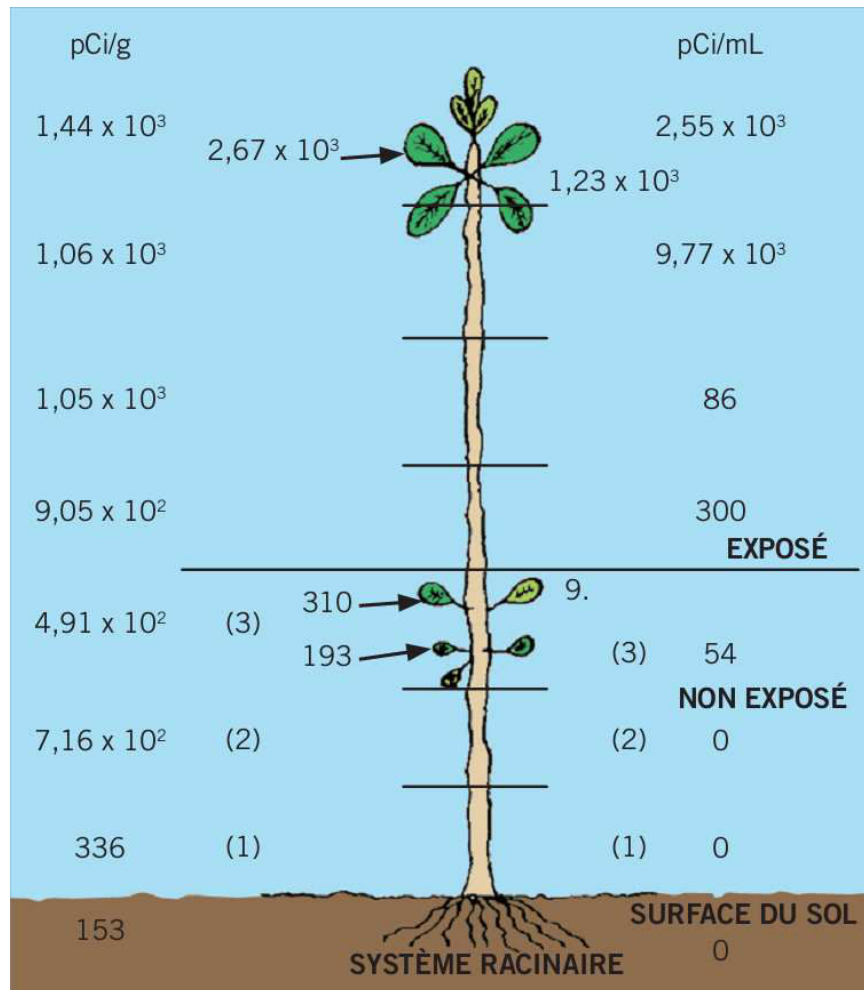
Dans les réactions chimiques au cours desquels une liaison O-H d'une molécule d'eau est rompue, la rupture de la liaison O-T intervient moins souvent que celle de la liaison O-H (Klinman, 2006). C'est le cas notamment dans les réactions **photosynthétiques** au cours desquelles du **NADPH** est produit via la photolyse de l'eau (**Figure 1-6**). Moins de tritium est alors incorporé dans les molécules organiques (Diabaté et Strack, 1993).



**Figure 1-6** : Les flux de sucre entre le chloroplaste et le cytoplasme. Le triose phosphate produit dans le chloroplaste par le cycle de Calvin est appauvri en tritium par rapport à l'eau. Le triose phosphate est transporté vers le cytoplasme qui devient enrichi en tritium durant les réactions telles que la glycolyse ou la glycogénèse (adapté de Luo et Sternberg, 1991)

Le sucre ainsi **photosynthétisé** est donc soit métabolisé (pour assurer des fonctions énergétiques ou structurelles) soit mis en réserve. Des études menées sur des algues unicellulaires (*Chorella sp.*) ainsi que sur des plantes cultivées (tournesol, blé, avoine, etc.) ont montré que le tritium suivait parfaitement ces différentes voies métaboliques chez les plantes, tant dans la circulation (Diabaté et Strack, 1993 ; Koranda et Martin, 1972 ; Thompson et Nelson, 1971) (**Figure 1-7**) que dans les produits issus du métabolisme des végétaux étudiés (Diabaté et Strack, 1997 ; Kanazawa *et al.*, 1972 ; Moses et Calvin, 1959)

bien que des différences dans les rapports T/H puissent être mesurés entre molécules, organes ou périodes d'exposition considérés. Dans toutes les expériences menées sur les plantes exposées au tritium, la **photosynthèse** apparaît comme la principale voie d'intégration de tritium sous forme organique non-échangeable (Boyer *et al.*, 2009b).



**Figure 1-7 : Concentration en tritium de l'eau libre (en pCi/mL) et de TOL (en pCi/g) dans un tournesol (*Helianthus annua*) sept heures après une exposition d'une demie-heure à de la vapeur tritiée (Koranda et Martin, 1972)**  
1 pCi = 3,7 10<sup>-2</sup> Bq

Le métabolisme **photosynthétique** des plantes considérées (C3, C4 ou CAM) module le niveau de la tritiation de la matière organique issue du métabolisme. D'une part, les variations dans l'importance de l'**évapotranspiration** entre ces différents métabolismes **photosynthétiques** induisent des enrichissements et des appauvrissements de l'eau libre de la plante par rapport à l'eau du sol et à l'eau atmosphérique. Ces différences s'expliquent par le fractionnement isotopique lors des changements de phases de l'eau, fractionnement d'autant

plus marqué que ces changements de phases concernent une grande quantité d'eau (Kim et Baumgärtner, 1994 ; Leaney *et al.*, 1985). D'autre part, l'importance des échanges entre les hydrogènes liés aux carbones avec l'eau durant le métabolisme des hydrates de carbones (plus importantes chez les CAM que chez les C3 et C4) impacte la différence de tritiation de la cellulose synthétisée par chacun de ces types de métabolisme (Luo et Sternberg, 1991 ; Sternberg *et al.*, 1984)(Figure 1-8).

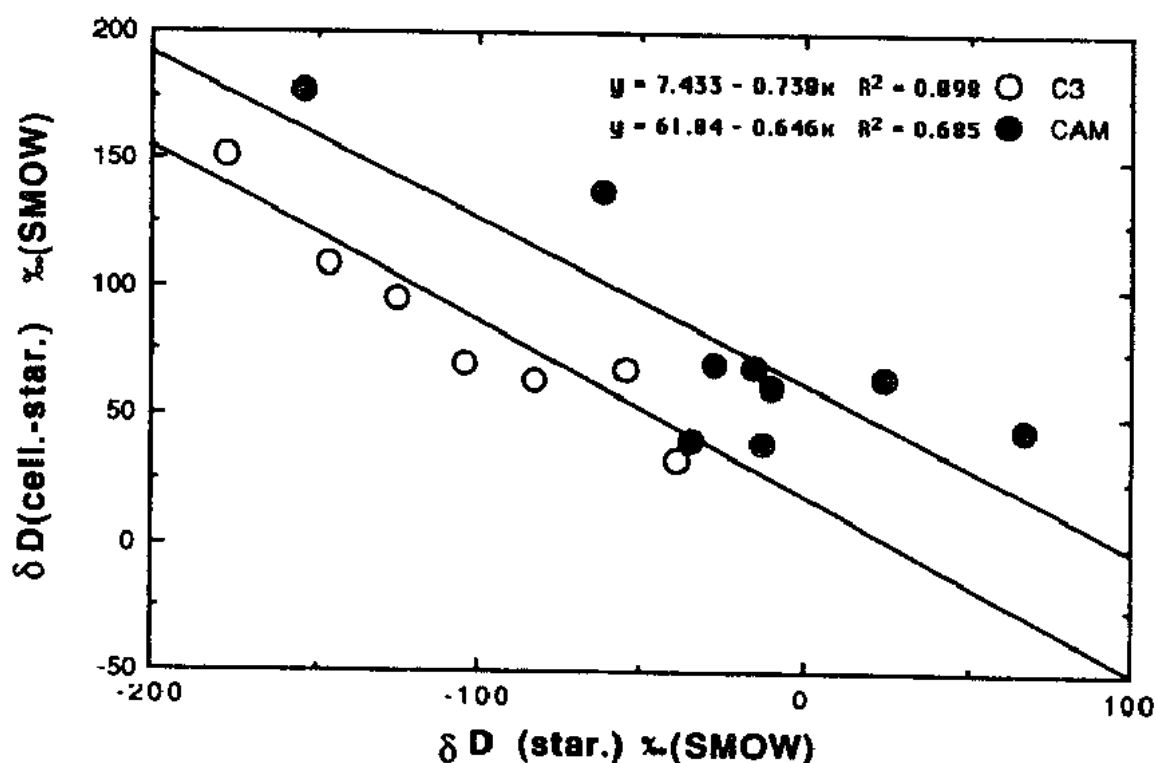


Figure 1-8 : La différence entre les valeurs de la cellulose et du nitrate d'amidon ( $\delta D_{\text{cell-star.}}$ ) et celles de l'amidon ( $\delta D_{\text{starch}}$ ) pour les plantes C3 (○) et CAM (●). La relation entre  $\delta D_{\text{cell-star.}}$  et  $\delta D_{\text{starch}}$  était très significative pour les plantes C3 et CAM avec respectivement un  $R^2 = 0,898$ ,  $p < 0,01$  et  $R^2 = 0,685$ ,  $p < 0,01$  (Luo et Sternberg, 1991)

$\delta D$  : écart entre les compositions isotopiques observées et le standard « Standard Mean Ocean Water » (SMOW)

Pour une espèce donnée, le taux d'incorporation du tritium sous forme organique est fonction de la croissance du végétal (Atarashi-Andoh *et al.*, 2002 ; Boyer *et al.*, 2009b ; Choi *et al.*, 2002) : plus le taux de production de biomasse est importante, plus la quantité de **TOLne** produite est importante (Amano *et al.*, 1995 ; Boyer *et al.*, 2009a). Il semble que la production de **TOLne** soit plus dépendante de la vapeur d'eau atmosphérique que de l'eau libre de la plante (Boyer *et al.*, 2010).

Cette relation entre le **TOLne** synthétisé par la plante et la vapeur d'eau atmosphérique semble être en contradiction avec la représentation générale de la circulation de l'eau au sein d'un végétal. Deux hypothèses permettent d'expliquer ce phénomène.

Tout d'abord, la mise en équilibre isotopique du tritium libre (sous forme d'eau libre ou de **TOLe**) entre les différents compartiments est permanente et rapide. Dans le cas où les tissus de la plante sont moins tritiés que l'atmosphère, elle induit une pénétration du tritium depuis l'atmosphère dans le sens du gradient du rapport isotopique, soit sous forme d'eau, soit par mise en équilibre du tritium libre de proche en proche.

La deuxième hypothèse est basée sur le fractionnement isotopique au cours des changements de phase de l'eau : l'**isotope** le plus lourd est concentré dans la phase condensée (voir la Partie 3.2.3 pour plus de détails). Ainsi, l'eau dans la **chambre sous-stomatique** se concentre progressivement en tritium alors que l'eau **évapotranspirée** en est appauvrie, jusqu'à une activité volumique d'équilibre, où l'activité volumique de la vapeur d'eau **évapotranspirée** atteint alors celle de l'eau du sol (Bariac *et al.*, 2000). De nombreux facteurs influencent alors la composition isotopique de l'eau dans la feuille, notamment la quantité d'eau prélevée à différentes profondeurs dans le sol (Biron et Bariac, 2002) et l'humidité relative de l'atmosphère (Edwards et Fritz, 1986).

De nombreuses mesures ont été faites sur des matrices variées prélevées, notamment dans l'environnement du centre de Valduc (laitue, blé, pomme, champignons, etc.). La comparaison des concentrations en tritium dans l'eau libre et dans la matière organique de ces échantillons ne montre pas de différence significative (IRSN, 2009).

On note que chez les arbres, dont une grande partie de la biomasse persiste pendant plusieurs dizaines d'années, toutes les études sur les cernes d'arbres montrent une bonne corrélation entre les mesures de **TOLne** et l'historique des rejets (Bourlat *et al.*, 2010 ; Love *et al.*, 2003 ; Vichot *et al.*, 2008). Cela constitue un autre signe de cette omniprésence du tritium dans les molécules synthétisées par les végétaux et de la persistance du **TOLne** égale à celle de la molécule tritiée.

Une fois incorporée dans les végétaux (sous forme de **TFWT** ou de **TOL**), le tritium est susceptible d'être ingéré par des animaux dont l'Homme et de suivre ainsi la chaîne alimentaire.

## 4. Données sanitaires du tritium

L'hydrogène est un élément essentiel dans le vivant. Il représente chez l'Homme environ 60 % des **atomes** (ICRP, 1976), essentiellement sous forme d'eau (celle-ci constituant environ 60 à 65 % de la masse corporelle humaine (Collège des enseignants de la Nutrition, 1994). L'hydrogène est également présent sous la forme d'une multitude de molécules organiques. On estime que chaque jour  $2,1 \cdot 10^{26}$  **atomes** d'hydrogène (soit 5 % de l'hydrogène du corps humain) contribuent à des réactions métaboliques. Ce sont autant de possibilités pour le tritium d'être intégré dans l'organisme (Hill et Johnson, 1993 ; ICRP, 1976).

### 4.1. Voies d'exposition au tritium

Du fait de la faible énergie du rayonnement ( $E_{\text{moy}}=5,8 \text{ keV}$ ,  $E_{\text{max}}=18,6 \text{ keV}$ ), il n'y a pas d'**exposition** des cellules cibles de la peau car celles-ci sont situées à environ 70  $\mu\text{m}$  de profondeur alors que le rayonnement du tritium ne parcourt que 6  $\mu\text{m}$  dans l'eau (Comte, 2005). Les risques liés à une **exposition externe** sont donc inexistants (INRS, 2009) et seules les situations d'**exposition interne** (après ingestion, inhalation ou absorption) sont à considérer.

Les animaux sont à la fois consommateurs d'eau et de matière organique. La matière organique qu'ils consomment leur permet à la fois d'assurer leur métabolisme énergétique et de construire et maintenir leur propre structure corporelle. Ces sources multiples et variées de tritiation conduisent à des marquages différents.

#### 4.1.1. L'eau tritiée

Environ 99,88 % du tritium terrestre est sous forme d'eau, dont 99 % dans les océans (Jacobs, 1968 ; UNSCEAR, 2008 ; Weaver *et al.*, 1969). C'est généralement la principale voie d'**exposition** au tritium. L'eau est essentielle à notre organisme et à notre métabolisme : un homme adulte a besoin de 2,5 L d'eau par jour pour compenser ses pertes d'eau (Potier de Courcy *et al.*, 2003). Environ 65 % de l'eau dont nous avons besoin est bue. Le reste provient des aliments (environ 30 %) et du **catabolisme** des molécules organiques (5 % environ) (Van den Hoek *et al.*, 1980). L'absorption cutanée et la respiration sont négligeables face aux autres voies d'absorption. Cependant, lorsqu'il s'agit d'eau tritiée, le gradient d'activité entre le milieu extérieur et l'organisme peut permettre un marquage sensible de l'eau libre de l'organisme par ces voies (Gulden et Raskob, 1992)

L'intégralité du HTO est intégrée (NCRP, 1979) et rejoint alors le compartiment de l'eau corporelle. Une fois dans l'organisme, quelle que soit la voie d'absorption, la concentration en HTO s'équilibre rapidement (entre 60 et 90 minutes) dans les différents fluides corporels (sang, salive, sueur, urines, lait) (Balonov *et al.*, 1974 ; Diabaté et Strack, 1993 ; Osborne, 1966 ; Pinson et Langham, 1957 ; Trivedi *et al.*, 2000). Ainsi, l'**exposition** aiguë à de l'HTO peut être considérée comme une **exposition** uniforme dans l'ensemble du corps (Straume et Carsten, 1993). De même, le milieu intracellulaire se met très rapidement (de l'ordre de 10 minutes) à l'équilibre avec le milieu extracellulaire (Balonov *et al.*, 1974 ; Hill et Johnson, 1993 ; Paganelli et Solomon, 1957).

Comme cela a été rappelé plus haut, la fraction labile de l'hydrogène des molécules organiques se met rapidement en équilibre isotopique avec les autres hydrogènes labiles de leur environnement proche, qu'ils soient portés par l'eau ou par d'autres molécules organiques. Ainsi, l'HTO absorbé diffuse non-seulement dans l'eau libre de l'organisme, mais également dans cet autre compartiment labile, estimé à 35 % de l'hydrogène organique (NCRP, 1979), et constitue alors du **TOLe**. Du point de vue de l'échange isotopique, le TOLe représente environ 5 % de l'hydrogène échangeable du corps, constitué essentiellement par l'hydrogène de l'eau (Culebras et Moore, 1977 ; Galeriu *et al.*, 2005b). Cependant, la vitesse de l'échange *in vivo* est extrêmement variable puisque les hydrogènes labiles moins accessibles du fait de l'encombrement stérique ou d'un éloignement avec la surface de la

molécule se mettent en équilibre bien moins rapidement (Diabaté et Strack, 1993 ; Galeriu *et al.*, 2008). L'activité physiologique et la morphologie de l'animal considéré influent également sur la vitesse des échanges isotopiques des **hydrogènes enfouis**. Il faut noter que la fraction échangeable du **TOL** n'induit pas de modification dosimétrique par rapport à l'HTO seule (Diabaté et Strack, 1993) tant leur **cinétique** et leur répartition sont liées.

L'eau ainsi que les molécules tritiées de manière labile entrent dans de nombreuses réactions métaboliques. Le tritium absorbé sous forme d'HTO est alors à l'origine de **TOLne** (Kistner, 1969 ; Rudran, 1988). L'évaluation de la fraction de tritium ingéré sous forme d'HTO qui est métabolisée en **TOLne** chez l'homme varie dans la littérature entre 0,5 % (Trivedi *et al.*, 1997) et 15 % (Rudran, 1988). La **CIPR** retient une valeur de 3 % (ICRP, 1989, 1993) pour la quantité de tritium intégrée sous forme de **TOLne** suite à l'absorption d'HTO. En situation d'exposition chronique, la concentration en **TOL** peut atteindre 20 à 70 % de la concentration ingérée du fait du renouvellement plus faible des hydrogènes organiques par rapport à ceux de l'eau (Komatsu *et al.*, 1981).

La **demi-vie** biologique de l'eau tritiée est d'abord fonction de la **demi-vie** biologique de l'eau (Balonov *et al.*, 1974 ; NCRP, 1979 ; Trivedi *et al.*, 1997). On estime ainsi que la **demi-vie** biologique de l'HTO dans le corps humain peut être décrite par la somme d'au moins 2 composantes. Selon la **CIPR** (ICRP, 1989), la première composante chez l'adulte a une période de 10 jours, comme l'eau. Elle concerne l'eau tritiée restant sous la forme d'eau libre (97 % de l'eau tritiée absorbée). La deuxième a une période de 40 jours. Elle est relative à l'eau tritiée ayant conduit à la synthèse de matière organique tritiée (les 3 % évoqués plus haut) dont l'**anabolisme** conduit de nouveau à de l'eau tritiée. Une troisième composante est évoquée par certains auteurs et correspondrait à 1 % de l'eau tritiée absorbée qui serait intégrée dans des molécules organiques à vie plus longue et dont la **demi-vie** biologique pourrait être de 280-550 jours (Moghissi *et al.*, 1972 ; Moghissi *et al.*, 1971). La CIPR a d'ailleurs publié en 2007 un document pour discussion (ICRP, 2007) dans lequel étaient repris un modèle proposé par Taylor (2003). Dans ce modèle, après l'ingestion d'eau tritiée, 99 % du tritium a une **demi-vie** de 10 jours, 0,98 % a une **demi-vie** de 40 jours et la troisième composante correspondrait à 0,02 % du tritium ingéré et aurait une **demi-vie** de 350 jours.

#### 4.1.2. Les molécules organiques tritiées

Dans les expériences d'**exposition** à différentes molécules organiques tritiées, les taux d'incorporation diffèrent en fonction de la nature des molécules. Balonov *et al.* (1993) opposent par exemple le D,L-**alanine** et le **glucose** (3 à 5 % incorporés sous forme de TOL) aux L-**tyrosine** et L-**lysine** (50 à 80 % d'incorporation). Les deux facteurs influençant selon eux l'incorporation sont l'intensité des échanges pour le métabolite et la capacité de l'organisme à synthétiser la molécule considérée.

Qu'elles soient absorbées telles quelles ou synthétisées par l'organisme, les molécules organiques tritiées entrent dans le métabolisme sans qu'un effet isotopique soit sensible (Straume et Carsten, 1993). Ainsi, la fraction assimilée, la voie métabolique suivie et le temps de résidence dans l'organisme sont déterminés par la nature de la molécule tritiée (Hill et Johnson, 1993 ; Smith, 1986).

Alors que le HTO diffuse rapidement et de manière homogène dans l'organisme, le **TOLne** synthétisé suite à une **exposition** à de l'eau tritiée présente une répartition hétérogène (Hill et Johnson, 1993), que ce soit entre les tissus/organes (voir par exemple le Tableau 1-2 et dans Commerford *et al.*, 1977 ; Komatsu *et al.*, 1990 ; Takeda, 1991 ; Thompson, 1952) ou entre molécules (voir par exemple le **Tableau 1-3** ainsi que dans Balonov *et al.*, 1974 ; Commerford *et al.*, 1977, 1983). Les différences observées montrent des corrélations nettes avec l'activité métabolique de l'organe (Diabaté et Strack, 1993 ; Takeda, 1991) ou le turnover des molécules considérées (Hill et Johnson, 1993 ; NCRP, 1979). L'importance de l'eau dans la synthèse des molécules considérées joue certainement un rôle également dans la rapidité et l'importance de leur tritiation suite à une exposition à de l'HTO.

**Tableau 1-2 : Activité en TOLt (en  $\mu\text{Ci g}^{-1}$  de masse fraîche) de différents organes le lendemain d'une injection d'eau tritiée chez des rats sub-adultes (Thompson, 1952)**

Organe	Cœur	Poumons	Foie	Reins	Estomac	Intestin grêle	Gros intestin	Cerveau	Sang	Graisse	Muscle	Os	Peau
OBTi	0,73	0,94	3,40	1,30	1,50	2,40	1,30	0,69	1,90	0,58	0,17	0,37	2,00

**Tableau 1-3 : Exemple de tritiation hétérogène entre des molécules et des tissus de rats suite à une exposition aiguë à de l'HTO (exprimé en  $\mu\text{Ci g}^{-1}$  masse sèche) (Thompson et Ballou, 1954).**

Temps depuis l'exposition		4 mois	8 mois
Peau	Collagène	1,30	1,00
	Phospholipide	0,31	0,08
Foie	Phospholipide	0,10	0,02



De nombreuses expériences ont consisté en l'**exposition** comparée, chronique ou aiguë, d'animaux à différentes molécules tritiées en utilisant généralement HTO et diverses molécules organiques spécifiques (voir par exemple Balonov *et al.*, 1993 ; Takeda, 1991 ; Taylor, 2008). On observe dans ces différentes expériences que plus la molécule participe au métabolisme énergétique (comme le **glucose** : Balonov *et al.*, 1993), plus elle aura une composante importante à **demi-vie** courte. Inversement, plus la molécule est impliquée dans des métabolismes structuraux (comme la **tyrosine** ou la **lysine**), plus la composante à vie-longue sera prédominante (Takeda, 1991).

Comme cela a été dit pour l'eau tritiée, les taux d'intégration (Takeda, 1991), les concentrations mesurées ((Balonov *et al.*, 1993 ; Takeda, 1991 ; Taylor, 2008) et les temps de résidence (Balonov *et al.*, 1993 ; Mewissen *et al.*, 1977 ; Taylor, 2008) des molécules organiques tritiées varient également entre tissus ou organes considérés du fait des différences de métabolisme. Deux paramètres influent alors sur le taux d'intégration et le temps de résidence : l'intensité du métabolisme du tissu ou de l'organe considéré (Thompson et Ballou, 1954) et l'importance relative dans cet organe du métabolisme énergétique et des activités de synthèse et de mise en réserve (Diabaté et Strack, 1993 ; Takeda, 1991). On voit par exemple dans le **Tableau 1-4** que les organes dont le renouvellement est important, comme l'intestin grêle, ont une forte concentration en **TOL** après ingestion de **thymidine** tritiée, base azotée spécifique à l'**ADN** contrairement au cerveau, dont le renouvellement est connu comme étant très faible à l'âge adulte. De même, le foie présente les plus fortes concentrations en **TOL** après l'exposition à des **acides aminés** tritiés, ce qui est cohérent avec sa fonction de synthèse et de stockage.

**Tableau 1-4 : Concentration relative en TOL de la matière sèche de différents organes de rats après une exposition chronique à différentes molécules tritiées (d'après (Takeda, 1991))**

Tissue	Relative concentration (percentage of activity administered per g dry tissue) <sup>a</sup>						
	<sup>3</sup> HHO	[ <sup>3</sup> H] Leucine	[ <sup>3</sup> H] Lysine	[ <sup>3</sup> H] Glucose	[ <sup>3</sup> H] Glucosamine	[ <sup>3</sup> H] Thymidine	[ <sup>3</sup> H] Uridine
Liver	5.4 ± 0.9	31.2 ± 3.2	41.5 ± 3.5	15.3 ± 2.5	10.2 ± 2.5	17.5 ± 1.8	29.2 ± 3.8
Kidney	4.7 ± 0.8	25.5 ± 2.8	35.3 ± 3.2	13.2 ± 1.7	9.6 ± 1.2	13.3 ± 1.6	21.4 ± 2.5
Testis	4.5 ± 0.8	26.8 ± 4.1	28.9 ± 2.9	11.5 ± 1.6	7.0 ± 0.5	12.5 ± 1.8	14.3 ± 1.7
Spleen	4.0 ± 0.6	19.5 ± 2.3	30.8 ± 2.5	11.4 ± 1.5	7.5 ± 0.9	8.4 ± 1.4	20.8 ± 2.3
Lung	4.2 ± 1.1	26.3 ± 3.2	30.5 ± 3.4	11.4 ± 1.8	7.3 ± 0.8	8.7 ± 0.6	16.7 ± 1.8
Heart	3.6 ± 0.6	31.1 ± 3.5	32.3 ± 2.6	11.3 ± 1.3	5.5 ± 0.5	9.0 ± 0.5	14.6 ± 1.3
Small intestine	4.4 ± 0.8	17.6 ± 3.2	23.6 ± 2.1	11.5 ± 2.2	8.9 ± 0.9	19.6 ± 2.5	23.1 ± 3.5
Muscle	3.3 ± 0.7	20.3 ± 2.5	26.5 ± 3.8	7.3 ± 0.6	5.7 ± 0.6	6.8 ± 0.3	7.7 ± 0.9
Brain	3.5 ± 0.5	16.9 ± 1.9	14.3 ± 1.6	8.4 ± 0.9	5.2 ± 0.5	7.3 ± 0.7	7.5 ± 0.8

<sup>a</sup>Each value is the mean ± SD of five rats for <sup>3</sup>HHO, [<sup>3</sup>H]leucine, [<sup>3</sup>H]glucose and [<sup>3</sup>H]thymidine and three rats for other tritiated compounds. All values for tritiated organic compounds were significantly higher than those in corresponding tissues for <sup>3</sup>HHO by Student's *t*-test at *p* < 0.01.

L'incorporation de tritium dans les molécules organiques de l'organisme étant dépendant du métabolisme, celle-ci évolue au cours de la croissance d'un individu.

Mewissen *et al.* (1977) ont injecté à des souris de différentes classes d'âge différentes molécules tritiées : HTO, **T-Thymidine**, **T-Uridine** et **T-Leucine** et ont mesuré les activités en tritium dans différents organes le lendemain de l'**exposition** et 29 jours après. Les résultats sont très contrastés.

Le lendemain de l'**exposition** à l'eau tritiée, l'activité dans l'eau libre est assez homogènement répartie et a des valeurs comparables quelle que soit la classe d'âge. Cependant, des différences marquées entre les organes et les classes d'âges apparaissent déjà quand on considère le tritium organique : par exemple les poumons, la rate et le foie des nouveaux nés et des juvéniles présentent une activité plus de deux fois inférieure à celles mesurées chez les adultes. On note également que chez les nouveaux nés, les activités tritium dans l'eau libre et en **TOLt** dans le cerveau, les reins et les autres organes (hormis rate, foie et poumons) augmentent entre le lendemain de l'injection et 29 jours après, fait unique parmi les observations.

Après l'injection de **thymidine** tritiée, les observations sont encore plus contrastées. On observe par exemple que le lendemain de l'injection les nouveaux-nés et les juvéniles présentent des activités en tritium lié jusqu'à 7 fois supérieures à celles observées chez les adultes. Chez les différentes classes d'âge, c'est la rate qui présente les activités massiques les plus fortes. Le foie des nouveau-nés présente une activité massique près de 20 fois supérieure à celle des adultes, ce qui illustre bien le lien entre l'intensité de l'activité métabolique et l'incorporation de tritium dans le **TOLne**

Le métabolisme du tritium étant fonction de sa **spéciation**, ses voies d'excrétion en dépendent également. Des travaux ont mesuré l'importance relative de l'urine et des fèces pour l'excrétion du tritium par le rat en fonction des molécules tritiées auquel il est exposé (Takeda, 1991 ; Trivedi et Cheng, 2000). On note que l'excrétion par les urines est maximale dans les situations d'**exposition** à de l'eau tritiée (**Tableau 1-5**).

Tableau 1-5 : Quantité totale de tritium excrété par les urines et les fèces chez le rat lorsqu'il est exposé chroniquement à différentes molécules tritiées (Takeda, 1991)

Chemical form of tritium	Percentage of radioactivity administered <sup>a</sup>		
	Urine	Faeces	(OBT fraction) <sup>b</sup>
<sup>3</sup> HHO	40.7 ± 3.4*	9.8 ± 1.9**	(9%)
[ <sup>3</sup> H]leucine	18.1 ± 1.5	16.9 ± 3.1	(48%)
[ <sup>3</sup> H]lysine	18.6 ± 2.1	16.6 ± 3.2	(41%)
[ <sup>3</sup> H]glucose	11.7 ± 1.6	24.7 ± 3.6	(63%)
[ <sup>3</sup> H]glucosamine	16.5 ± 2.2	26.8 ± 2.8	(65%)
[ <sup>3</sup> H]thymidine	19.4 ± 2.1	14.6 ± 2.1	(44%)
[ <sup>3</sup> H]uridine	21.0 ± 2.8	15.9 ± 2.8	(59%)

<sup>a</sup>Each value is the mean ± SD of five rats for <sup>3</sup>HHO, [<sup>3</sup>H]leucine, [<sup>3</sup>H]glucose and [<sup>3</sup>H]thymidine and three rats for other tritiated compounds.

<sup>b</sup>Values in parentheses show OBT fraction, expressed as percentage of total tritium activity excreted in faeces.

\*Significantly higher than the values for all other tritiated compounds by Student's *t*-test at *p* < 0.01.

\*\*Significantly lower than the values for all other tritiated compounds by Student's *t*-test at *p* < 0.05.

Les modalités d'**exposition** sont susceptibles de faire varier grandement les valeurs mesurées. Par exemple, dans des exemples d'**exposition** à de la **thymidine** tritiée, les taux d'incorporation et d'**anabolisme** varient très sensiblement :

- Lambert et Clifton (1968) estiment que seulement 2 % de la **thymidine** tritiée ingérée sont incorporés à l'**ADN** ;
- Mewissen *et al.* (1977) rapportent que 10 % de la **thymidine** injectée sont incorporés dans l'**ADN** et que le reste est **catabolisé** en eau tritiée et autres métabolites ;
- Hill et Johnson (1993) considèrent qu'entre 40 et 60 % de la **thymidine** injectée à des personnes sont métabolisés en eau, le reste étant incorporé dans l'**ADN**.

Ces différences s'expliquent d'abord par le mode d'**exposition**. En effet, lors de l'ingestion de molécules tritiées, la digestion est susceptible de les métaboliser (au moins en partie) avant leur passage dans le sang. C'est le cas notamment de la **thymidine** qui est essentiellement dégradée en **thymine** dans le système gastro-intestinal (Balonov *et al.*, 1993). L'autre paramètre susceptible d'induire les différences observées entre ces expériences est la part des besoins journaliers que couvre la quantité absorbée : plus elle sera grande, plus elle sera

dégradée rapidement si les molécules ne sont pas rapidement mises en réserves. Cependant, les données permettant de prendre en compte ce paramètre sont rarement présentées. Enfin, le taux d'incorporation des molécules tritiées absorbées dépend du taux de renouvellement de la molécule dans l'organisme, l'organe ou même la cellule. Dans l'exemple de la **thymidine**, plus un tissu aura un taux de renouvellement et de division cellulaire important, plus la quantité d'**ADN** synthétisé sera importante et plus la **thymidine** tritiée sera intégrée.

Alors qu'il est question d'injection ou d'ingestion de molécules organiques tritiées spécifiques (**thymidine** tritiée, **glucose** tritié, etc.), il est uniquement question de **TOL** (total ou non-échangeable) dans les résultats du métabolisme de l'organisme étudié. Cela est dû à la difficulté de séparer la grande variété de molécules organiques qui composent un organisme et à la quantité d'échantillon nécessaire pour mesurer le tritium (voir 1.2). Ainsi on utilise les concepts de **TOL** (total, échangeable ou non-échangeable) qui sont basés sur notre capacité de séparer le tritium dans ces compartiments, pour évaluer la tritiation globale de la matière organique.

Cette distinction, commode d'un point de vue analytique, simplifie trop le métabolisme des molécules organiques pour rendre compte et comprendre le devenir du tritium dans un organisme ou dans un écosystème. Cette conception, suffisante pour la surveillance de l'environnement (compte tenu de la dynamique de l'eau et des faibles niveaux d'activité mesurés autour des principaux **émissaires**), n'est cependant pas satisfaisante pour une exploitation des données sous un angle fondamental ou toxicologique. Une plus grande précision dans l'étude du métabolisme des molécules organiques tritiées est donc un enjeu de radiotoxicologie. Les travaux actuels vont dans ce sens.

#### 4.1.3. Exposition à d'autres formes de tritium

L'**exposition** à de l'hydrogène tritié conduit à une très faible incorporation : chez l'Homme, environ 0,004 % est converti en eau tritiée lors de l'inhalation aiguë d'HT et rejoint alors l'eau libre (Pinson, 1951). A activité équivalente, le risque d'une **exposition** à de l'HT est donc 25 000 fois inférieur à celui d'une **exposition** à de l'HTO (Galeriu *et al.*, 2008).

Les autres formes auxquelles des travailleurs peuvent être exposés sont essentiellement de l'huile tritiée de pompe, une fraction volatile ou en **aérosols**, et des particules métalliques tritiées (Hill et Johnson, 1993). L'**exposition** se ferait alors essentiellement par inhalation ou par absorption cutanée en ce qui concerne l'huile (Trivedi, 1995).

Les expériences menées sur l'**exposition** de rats montrent que lors d'une **exposition** à de l'huile de pompe, du **TOL** et de l'HTO sont mesurés dans l'organisme. Dans ce cas, le **TOL** a cependant une **demi-vie** plus courte que pour des molécules du métabolisme. L'excrétion se fait par les urines, les fèces et par exhalation (Trivedi et Cheng, 2000).

Une fois inhalées, les particules métalliques tritiées sont susceptibles d'intégrer l'organisme par dilution ou élution depuis les poumons. Le temps de résidence des particules tritiées dans les poumons dépend de leur diamètre mais apparaît globalement plus long que lors de l'inhalation d'huile tritiée de pompe, ainsi que les **demi-vies** du tritium une fois dans l'organisme (Trivedi et Cheng, 2000).

Le facteur de conversion de dose dans l'exemple de particules de  $\text{LaNi}_{4,25}\text{Al}_{0,75}$  (LANA.75) tritiées est inférieur à celui de l'eau tritiée (Farfan *et al.*, 2012). L'huile de pompe tritiée peut être considéré comme des particules insolubles (particule inhalée de type S selon ICRP, 1994) du point de vue de la radioprotection et de la dosimétrie, sans pour autant que la classification en Type M puisse être exclue (Priest *et al.*, 2013).

## 4.2. Pour l'évaluation dosimétrique d'une exposition à des molécules tritiées

### 4.2.1. Les mécanismes en jeu

La faiblesse du rayonnement du tritium fait que les méthodes dosimétriques usuelles (dosimétrie photographique individuelle, chambres d'**ionisations**, etc.) n'apportent pas d'informations sur l'**exposition** au tritium (Okada et Momoshima, 1993). Compte tenu de la rapide et complète mise à l'équilibre dans les différents fluides corporels, les examens radio-toxicologiques urinaires permettent en revanche de détecter des faibles activités tritium,

représentatives de l'activité volumique dans l'ensemble de l'eau de l'organisme (Balonov *et al.*, 1974 ; Diabaté et Strack, 1993 ; Osborne, 1966 ; Trivedi *et al.*, 2000).

Cependant, Etnier *et al.* (1984) ont mis en évidence que la mesure de l'activité tritium (HTO et TOL) dans l'urine en situation d'**exposition chronique** à de faibles activités tritium sous-estime l'activité tritium dans le sang ou dans d'autres tissus, que ce soit en HTO ou sous une autre forme. Trivedi *et al.* (2000) trouvent au contraire que durant et après l'**exposition chronique** à de l'HTO, l'activité volumique de l'HTO d'une part et de l'eau de combustion de la matière sèche d'autre part sont très proches dans l'urine et le sang. Compte tenu des faibles écarts dans les situations d'**exposition** à de l'HTO ou de l'HT et de la facilité de réalisation des prélèvements urinaires par rapport aux prélèvements sanguins, ceux-ci restent le moyen le plus pertinent de suivre l'**exposition** au tritium (Diabaté et Strack, 1993).

Le tritium pouvant être dans l'organisme à la fois sous forme d'eau libre et liée à des molécules organiques, on peut considérer que sa désintégration a trois effets qui peuvent se cumuler :

- l'émission d'un **rayonnement  $\beta^-$**
- le dégagement d'une énergie lors de la **transmutation**
- la production d'un **atome** d' $^3\text{He}$  en lieu et place de l'**atome** de tritium.

Comme écrit plus haut, le rayonnement émis lors de la désintégration du tritium est faible comparé à d'autres **radionucléides** :  $E_{\text{moy}}=5,8 \text{ keV}$ ,  $E_{\text{max}}=18,6 \text{ keV}$  à comparer à celles du  $^{14}\text{C}$  :  $E_{\text{moy}}=49,4 \text{ keV}$ ,  $E_{\text{max}}=156,5 \text{ keV}$  (Hubert, 2010). Cette faible énergie fait que l'électron émis dépose toute son énergie sur une faible distance et qu'il y a ainsi une forte densité d'**ionisation** : par exemple, 68 % de l'énergie du rayonnement de la [ $^3\text{H}$ ]**thymidine** sont déposés dans le noyau contre seulement 19 % pour la [ $^{14}\text{C}$ ]**thymidine** dans les mêmes conditions (Saintigny *et al.*, 2008). On exprime cela par le **transfert d'énergie linéique** (TEL, en  $\text{keV } \mu\text{m}^{-1}$ ) qui est entre  $0,03 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$  et  $8 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$  pour le tritium (Ellet et Braby, 1972) alors que pour le rayons gamma émis par le  $^{60}\text{Co}$  il est de  $0,22 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$  (Barbey et Boilley, 2010). Ainsi, lors de la désintégration d'un tritium situé dans le noyau d'une cellule,

---

<sup>3</sup> Le rayonnement  $\gamma$  du  $^{60}\text{Co}$  est un des rayonnements de référence dans l'évaluation de l'EBR.

l'énergie émise peut être intégralement déposée dans le noyau (NCRP, 1979) et la dose reçue par la cellule importante (Hill et Johnson, 1993).

L'énergie associée à la **transmutation** du tritium étant très faible (0-11 eV) (Grosse *et al.*, 1951 ; Hill et Johnson, 1993), on estime qu'elle n'est pas susceptible de casser de **liaison covalente** (NCRP, 1979) et que ses effets sont négligeables devant l'énergie du rayonnement émis (Feinendegen et Bond, 1973 ; Hill et Johnson, 1993).

Enfin, l'**atome** d' $^3\text{He}$  produit par la désintégration du tritium a une énergie de liaison extrêmement faible avec la molécule à laquelle était lié l'**atome** de tritium. La liaison se rompt ainsi très rapidement : la **demi-vie** d'une liaison C- $^3\text{He}$  est estimée à  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  s (Teebor *et al.*, 1984). L' $^3\text{He}$  est alors libéré, laissant un oxydant puissant (comme par exemple un carbocation). Ce phénomène est loin d'être anecdotique : (Tisljar-Lentulis *et al.*, 1983) ont montré que dans le cas d'**ADN** tritié, ce phénomène peut être à l'origine de près d'un tiers des ruptures simple brin, contribuant ainsi à ce que l'Efficacité Biologique Relative (**EBR**) du tritium soit plus élevé que 1. La NCRP (1979) considère cependant que cet effet est négligeable par rapport aux effets du **rayonnement  $\beta^-$**  même lorsque le tritium est dans un acide nucléique, conclusions partagées par Feinendegen et Bond (1973) ainsi que par Carsten (1979).

Nagasawa et Little (1999) ont été les premiers à montrer que des cellules pouvaient montrer les effets liés à une **exposition** à des rayonnements ionisants alors même qu'elles n'y ont pas été soumises à condition toutefois que des cellules adjacentes ou à proximité aient été irradiées (Gerashchenko et Howell, 2003). Cela a été appelé l'effet de proximité ou de voisinage (*bystander effect*). Ces effets prennent plusieurs formes comme une prolifération cellulaire accrue (Gerashchenko et Howell, 2003, 2004), la mutation des cellules (Nagasawa et Little, 1999 ; Persaud *et al.*, 2007) et l'adaptation aux rayonnements ionisants (Audette-Stuart et Yankovitch, 2011 ; Pinto *et al.*, 2010). La contribution de l'effet *bystander* aux conséquences globales d'une **exposition** à du tritium n'est pas estimée jusqu'à présent.

#### 4.2.2. Incorporation et demi-vies biologiques

On estime que seul 1 à 3 % du tritium absorbé sous forme d'eau passe sous forme organique (Diabaté et Strack, 1993 ; ICRP, 1989 ; IRSN, 2009). Des fractions supérieures (de l'ordre de 5-15 %) sont exprimées par Rudran (1988) suite au suivi de 8 travailleurs ayant ingéré accidentellement de l'eau fortement tritiée.

L'incorporation de molécules tritiées varie en fonction de la nature chimique. Par exemple, les **acides aminés** essentiels, comme la **lysine** et la **leucine**, lorsqu'ils sont tritiés, induisent des concentrations dans les tissus 4 à 9 fois supérieures qu'après l'**exposition** à des mêmes activités d'HTO (Takeda, 1991). Toutes les molécules organiques tritiées ne conduisent pas aux mêmes résultats. Dans sa revue, Taylor (2008) compare des données de différentes molécules pharmacologiques tritiées dont certaines conduisent à une excrétion du tritium plus rapide qu'après l'ingestion d'eau.

La CIPR considère que 50 % du tritium est incorporé par l'organisme sous forme de **TOL** lorsque c'est à du **TOL** qu'il est exposé (ICRP, 1976, 1989, 1993 ; IRSN, 2009). On peut noter qu'il n'y a pas de distinction entre les formes organiques du tritium dans ces chiffres alors que celles-ci influencent le taux d'incorporation et le temps de résidence (Harrison, 2009). Cependant, compte tenu des voies d'**exposition** les plus probables (à de l'eau tritiée ou à des aliments produits dans une ambiance tritiée), cette distinction ne semble pas nécessaire pour le suivi des populations exposées. Si les fractions de tritium retenues diffèrent, une fois incorporé, le tritium suit les voies métaboliques propres à sa **spéciation**, quelle que soit sa forme d'origine.

Ainsi, chaque molécule tritiée est susceptible d'avoir une **demi-vie** propre. Cependant, compte tenu des méthodes d'études, la **demi-vie** biologique de molécules tritiées (et non la **demi-vie** biologique du **TOL** suite à l'absorption de molécules tritiées) a été l'objet de peu d'études. Dans le **Tableau 1-3**, on a un exemple où, pour un organe donné (la peau), la concentration en tritium des phospholipides est comparée à celle du collagène le lendemain et 29 jours après l'injection d'eau tritiée à des rats. D'après ces quelques données, la **demi-vie** apparente des phospholipides est de 14,5 jours (elle apparaît sensiblement la même dans le foie) alors qu'elle apparaît proche de 75 jours pour le collagène (Thompson et Ballou, 1954).



Comme pour le taux d'intégration, la **demi-vie** biologique du **TOLne** varie également d'un organe à l'autre (Diabaté et Strack, 1993 ; Harrison *et al.*, 2002 ; Thompson, 1952 ; Van den Hoek *et al.*, 1983). La **demi-vie** du **TOL** apparaît comme étant à 2 ou 3 composantes. La période de ces composantes mais également leur contribution relative à la décroissance globale apparaissent très variables d'un organe à l'autre pour un organisme donné (**Tableau 1-6**). Ces variations sont certainement liées au taux de renouvellement de l'organe ainsi qu'à celui des molécules qui le composent. Cependant, peu d'informations sont disponibles sur ce dernier point.

D'un point de vue global, il est généralement satisfaisant de considérer que le tritium a une **demi-vie** à 3 composantes dont les contributions relatives varient en fonction de différents paramètres. Chez l'homme adulte, la première composante a une **demi-vie** biologique de l'ordre de 10 jours et correspond à la fraction du tritium qui est sous forme d'eau tritiée. La **demi-vie** biologique de la deuxième composante retenue par l'ICRP (1989) est de 40 jours mais varie selon les auteurs : 30 jours pour Moghissi *et al.* (1971 ; 1972). La troisième composante a une période de 250 jours selon Taylor (2003) et entre 140 et 550 jours pour Harrison *et al.* (2002), Moghissi *et al.* (1971 et 1972). La deuxième et la troisième composante correspondent à du **TOLne** dont la **cinétique d'anabolisme** est variable en fonction des molécules concernées (Balonov, Dolgirev et al. 1974; Commerford, Carsten et al. 1982; Rudran 1988). Dans le cas d'une **exposition** aiguë à de l'eau tritiée, Taylor (2003) estime la contribution respective de ces 3 composantes à 99,00 %, 0,98 % et 0,02 %.

La CIPR retient actuellement l'hypothèse de deux composantes : une de période de 10 jours (correspondant à la **demi-vie** biologique de l'eau) et une de 40 jours (plus longue que la composante « moyenne » généralement observée), correspondant à la **demi-vie** biologique du carbone (ICRP, 1989). Cela se justifie par le fait que la liaison Carbone-Tritium est supposée perdurer jusqu'à l'**anabolisme** de la molécule qui la porte. Les coefficients de doses ne sont pas significativement différents que l'on considère un modèle à 3 compartiments tel que décrit par Taylor (2003) ou à 2 compartiments tel que considéré par la CIPR (Harrison, 2009).

**Tableau 1-6 : Estimation des demi-vies des composantes du TOL de différents organes et leur contribution relative au TOL de l'organe suite à l'injection d'eau tritiée chez des souris adultes (demi-vie biologique de l'eau tritiée chez la souris : 3,3 jours) (d'après Thompson, 1952)**

Organe / Tissu	Compartiment à vie courte		Compartiment à vie moyenne		Compartiment à vie longue	
	Demi-vie (jours)	Contribution au TOL	Demi-vie (jours)	Contribution au TOL	Demi-vie (jours)	Contribution au TOL
Cœur	6,6	91,1	25,1	7,7	83,4	1,2
Poumons	6,4	92,2	40,5	6,1	185,0	1,7
Foie	4,4	97,6	25,1	1,9	53,1	0,5
Reins	6,0	95,0	20,6	3,3	58,3	1,7
Estomac	3,9	91,1	17,7	7,0	166,7	1,8
Intestin grêle	4,2	92,5	20,0	6,5	91,0	0,9
Gros intestin	5,6	89,8	20,0	8,9	333,4	1,3
Cerveau	5,0	62,6	20,0	32,5	250,0	8,0
Sang	5,2	63,8	10,6	26,3	14,1	9,8
Graisse			14,5	89,1	53,7	10,9
Muscles	6,2	71,9	20,4	23,1	62,3	5,0
Os	6,8	76,5	101,0	16,8	2398,0	6,7
Peau	6,2	84,4	70,0	11,7	349,1	3,9

La **demi-vie** biologique du tritium varie également en fonction de l'âge. Que le tritium soit sous forme d'eau tritiée ou de **TOL**, la **demi-vie** augmente avec l'âge de l'organisme (**Tableau 1-7**). La CIPR a pris en compte cette variabilité (ICRP, 1989).

**Tableau 1-7 : Données biocinétiques pour la rétention du tritium chez les adultes et les enfants, (Harrison *et al.*, 2002)**

Age	Demi-vie biologique (jours)	
	A	B
3 mois	3,0	8,0
1 an	3,5	15,0
5 ans	4,6	19,0
10 ans	5,7	26,0
15 ans	7,9	32,0
Adulte	10,0	40,0

Après absorption de HTO, A représente 97 % et B 3 %.

Après absorption de TOL, A représente 50 % et B 50%.

Enfin, le sexe semble également déterminant dans la **demi-vie** biologique du tritium. Richardson *et al.* (2001) et Melintescu *et al.* (2007) montrent à l'aide de modèles que le taux de rétention pour une femme suite à l'ingestion d'aliments tritiés serait supérieur à ce qui est attendu selon la **CIPR** : respectivement +20-46 % et + 100 %. On note également que l'intégration de tritium dans les oocytes induirait un temps d'**exposition** plus long que toute autre situation de tritiation puisqu'elle perdurerait de la différenciation des oocytes jusqu'à leur maturation en ovules (HPA, 2007).

### 4.2.3. Evaluation des effets sanitaires et dosimétrie

De nombreuses expériences ont été menées pour qualifier et quantifier la survenance d'effets suite à une **exposition** à du tritium (HPA, 2007). Les différents effets observés à fortes doses sont similaires à ce qu'induisent d'autres sources de rayonnements (**Tableau 1-8**).

**Tableau 1-8 : Différents effets sanitaires induits par des expositions à des molécules tritiées**

	Expériences in vivo	Expériences in vitro
Mort cellulaire	(Dobson et Kwan, 1976 ; Ijiri, 1989 ; Satow <i>et al.</i> , 1989b)	(Person et Bockrath, 1964 ; Teebor <i>et al.</i> , 1984 ; Ueno <i>et al.</i> , 1982 ; Yamada <i>et al.</i> , 1982)
Aberrations chromosomiques et mutations (létales ou non)	(Chopra et Heddle, 1988 ; Kozlowski <i>et al.</i> , 2001 ; Russel <i>et al.</i> , 1978 ; Zhou <i>et al.</i> , 1986 ; Zhou <i>et al.</i> , 1989)	(Kamiguchi <i>et al.</i> , 1990 ; Matsuda <i>et al.</i> , 1986 ; Moiseenko <i>et al.</i> , 2001b ; Person et Bockrath, 1964 ; Tanaka <i>et al.</i> , 1994 ; Vulpis, 1984)
Perte de masse d'un organe	(Carr et Nolan, 1979 ; Rusinova <i>et al.</i> , 1989)	
Survenue de tumeurs ou de cancers	(Gragtmans <i>et al.</i> , 1984 ; Johnson <i>et al.</i> , 1995 ; Mewissen <i>et al.</i> , 1977 ; Revina <i>et al.</i> , 1984 ; Seyama <i>et al.</i> , 1991)	
Effets tératogènes	(Satow <i>et al.</i> , 1989a)	

#### 4.2.3.1 Efficacité biologique relative

La plupart de ces études ont permis de comparer l'efficacité biologique du tritium à celle de rayonnements de références. Ainsi, l'**EBR** du tritium a une valeur de 1,4 comparé à l'**exposition** chronique à des **rayons X** ou de 2,2 si c'est à des **rayons  $\gamma$**  ( $^{60}\text{Co}$  ou  $^{137}\text{Cs}$ ) (Dobson and Kwan 1976; Straume and Carsten 1993; HPA 2007; Little and Lambert 2008; Little and Wakeford 2008; CCSN 2010). Cette différence dans l'**EBR** du rayonnement du

tritium selon le rayonnement de référence est comparable à ce qui est habituellement observé (Goodhead, 2009 ; HPA, 2007). La **CIPR** privilégie généralement le rayonnement  $\gamma$  comme rayonnement de référence (ICRP, 2003). Plusieurs auteurs estiment donc qu'une valeur unique d'**EBR** égale à 1 telle que retenue par la **CIPR** sous-estime le risque sanitaire du tritium et proposent une revalorisation à 2 voire 3 (Harrison, 2009 ; HPA, 2007 ; Little et Wakeford, 2008 ; Melintescu *et al.*, 2007 ; Moiseenko *et al.*, 2001a ; Moiseenko *et al.*, 2001b).

Les effets biologiques liés à une forte **exposition interne** à des molécules tritiées varient en fonction de trois paramètres : leur taux d'incorporation, leur temps de résidence et leur répartition dans l'organisme (CCSN, 2010), notamment au niveau cellulaire (Tisljar-Lentulis *et al.*, 1983). On note qu'à activité équivalente, la **thymidine** tritiée induit plus de morts cellulaires que l'uridine tritiée, elle-même plus « efficace » que l'**histidine** tritiée ou la **leucine** tritiée (Person et Bockrath, 1964). Ces différences semblent être corrélées avec la concentration plus ou moins importante du composé dans le noyau ou son voisinage immédiat (Hill et Johnson, 1993). Le taux d'incorporation des différentes molécules tritiées étant également différent, la dose incorporée peut varier d'un facteur 2.

#### 4.2.3.2 La radiotoxicité des molécules tritiées

Compte tenu des caractéristiques de son rayonnement, le tritium partage certaines caractéristiques avec les émetteurs  $\beta^-$  de faible énergie comme la haute densité d'**ionisation** à l'échelle cellulaire voire subcellulaire, la non-uniformité des doses absorbées au niveau des tissus et organes et l'effet de la **transmutation** (Goodhead, 2009). La quantité d'énergie déposée dans les noyaux est un paramètre qui influe sur la viabilité des cellules et sur le déclenchement des mécanismes de réparation à fortes doses, ceux-ci pouvant induire des altérations et instabilités génétiques notamment après l'incorporation de nucléotides radioactifs. C'est en cela que Saintigny *et al.* (2008) considèrent que les risques de **mutagénicité** liés au tritium font partie des préoccupations actuelles.

Actuellement, aucune donnée ne permet de dire qu'il existe un organe, un tissu ou une molécule dans lequel se concentre le tritium après une **exposition**, qu'elle soit chronique ou

aiguë. Ainsi, il est couramment estimé que les différentes molécules organiques tritiées ont globalement le même **EBR**, proche de celui d'HTO, compte tenu du fait qu'elles sont diffusées dans l'ensemble de l'organisme (CCSN, 2010 ; Straume et Carsten, 1993). Seule la **thymidine** tritiée semble capable d'induire une irradiation préférentielle du noyau et ainsi présenter un risque accru dû à la concentration comme l'estimaient Hill et Johnson (1993).

Plusieurs auteurs font mention d'une concentration de HTO dans les couches d'hydratation de l'**ADN** mais également dans les liaisons hydrogènes à l'intérieur du **biopolymère** (Baumgärtner et Donhaerl, 2004 ; Baumgärtner et Kim, 2000). Ce mécanisme induirait une concentration en tritium deux à trois fois plus importante dans l'**ADN** hydraté que dans l'eau du milieu. Cependant, compte tenu que l'**ADN** ne représente qu'une faible fraction de la cellule (5 % en masse), le risque de dommages à l'**ADN** provient plus du tritium du milieu intracellulaire (Galeriu *et al.*, 2006).

Considérant que du **TOL** peut être synthétisé après absorption de HTO, le coefficient de dose de l'HTO semble devoir être augmenté de la dose due à la fraction organique, soit 6,9 +/- 3,1 % selon Trivedi *et al.* (1997 et 2000) si on considère une répartition homogène du tritium dans le corps. Certains auteurs évoquent même une différence dans les effets allant de +40 % à + 240 % (Rudran, 1988). Cependant, compte tenu de la disparité observée entre les organes (voir **Tableau 1-6**), il paraît même pertinent de prévoir une augmentation de + 22 % (Galeriu *et al.*, 2006 ; Richardson et Dunford, 2003). Le modèle développé par les auteurs de ce dernier donne un coefficient de dose pour l'ingestion de TOL 1,2 fois celui préconisé par la **CIPR**.

De même, il n'y a pas à l'heure actuelle d'étude épidémiologique permettant d'évaluer correctement le risque d'une **exposition** à des molécules tritiées : soit les données sont trop parcellaires (notamment sur les conditions d'**exposition** ainsi que sur les effets sur la santé), soit l'**exposition** est composite et ne permet donc pas de quantifier les risques spécifiques du tritium, soit les cohortes sont trop petites pour avoir une puissance statistiques suffisante (CCSN, 2010 ; HPA, 2007 ; IRSN, 2009 ; Little et Wakeford, 2008).

#### 4.2.3.3 Tritium et faibles doses

Dobson et Kwan, (1976) concluent à une augmentation de l'**EBR** du tritium avec la diminution de la dose d'**exposition** : 1,6 lorsque la dose est de 400 mGy et 3 lorsque qu'elle est de l'ordre de 10 mGy. Dans Saintigny *et al.*, 2008, les auteurs ont observé des faits similaires : en comparant les effets induits par de la [<sup>3</sup>H]**thymidine** tritiée, par de la [<sup>14</sup>C]thymidine et par des rayons gamma, ils ont observé que la **thymidine** tritiée induisait plus d'effets à faible dose que la [<sup>14</sup>C]**thymidine** (LD<sub>30</sub>s de la [<sup>3</sup>H]**thymidine** : 470 mGy par noyau ; LD<sub>30</sub>s de la [<sup>14</sup>C]**thymidine** : 1,53 Gy par noyau), les **rayonnements gamma** n'induisant pas d'effet pour des doses équivalentes. De même, il a été observé une augmentation des effets avec la diminution du débit de dose (entre 18 mGy h<sup>-1</sup> et 900 mGy h<sup>-1</sup>) (Tauchi *et al.*, 2002). Dans certaines expériences, il a été montré que l'**exposition** à des doses non-létales délivrées par des molécules tritiées (comme à d'autres sources de rayonnements : voir par exemple Ikushima *et al.*, 1996) provoquait l'induction de mécanismes efficaces de réparation de l'**ADN** chromosomique (Cortés *et al.*, 1990 ; Okada et Momoshima, 1993).

Les coefficients de dose de l'HTO et de TOL retenus par la **CIPR** dans l'état actuel des connaissances sont différents et varient en fonction de l'âge (**Tableau 1-9**).

**Tableau 1-9 : Coefficients de doses retenus par la CIPR pour l'HTO et le TOL selon l'âge de la personne exposée d'après (Hill et Johnson, 1993)**

Age	HTO (Sv Bq <sup>-1</sup> )	TOL (Sv Bq <sup>-1</sup> )
3 mois	5,5 x 10 <sup>-11</sup>	1,0 x 10 <sup>-10</sup>
1 an	4,1 x 10 <sup>-11</sup>	1,1 x 10 <sup>-10</sup>
5 ans	2,6 x 10 <sup>-11</sup>	6,7 x 10 <sup>-11</sup>
10 ans	1,9 x 10 <sup>-11</sup>	5,4 x 10 <sup>-11</sup>
15 ans	1,6 x 10 <sup>-11</sup>	4,0 x 10 <sup>-11</sup>
Adultes	1,6 x 10 <sup>-11</sup>	4,0 x 10 <sup>-11</sup>

Les questions de radioécologie et de radiotoxicologie sont encore nombreuses en ce qui concerne le tritium.

Tout d'abord, les méthodes de séparations et de mesures des différentes formes du tritium souffrent encore d'un manque d'uniformité entre les auteurs bien que les méthodes employées convergent progressivement. Le constat est le même quant à l'emploi de la terminologie, surtout lorsqu'il est question de **TOL** ou d'**OBT**, termes qui sont entachés d'ambiguïté. Ces lacunes peuvent être à l'origine de défauts dans la représentation qu'on se fait de la répartition du tritium dans les différents compartiments de l'environnement et en particulier ceux du vivant.

Ensuite, la circulation du tritium le long de chaînes alimentaires est encore l'objet de peu d'études, notamment concernant les situations d'**exposition** chronique d'écosystèmes continentaux. La connaissance des transferts du **TOLne** est particulièrement pauvre en résultats (Thompson *et al.*, 2011). Une des difficultés de ces études est la multiplicité des formes de **TOLne** possibles alors que ce point conditionne justement les équilibres de transferts entre compartiments. Une plus grande précision dans l'étude des formes de **TOLne** apparaît donc comme nécessaire, en progressant vers la mesure de l'activité tritium des différentes molécules composant une matrice.

Deux questions de radiotoxicologie découlent de ces constats :

- existe-t-il des voies de transfert privilégiées de molécules pouvant conduire à des enrichissements ou appauvrissements à l'échelle de l'organisme, de l'organe, du tissu ou de la cellule ?
- existe-t-il des molécules tritiées ayant une radiotoxicité significativement supérieure à ce qui est estimé actuellement pour le tritium sous forme d'eau ou de matière organique générique ?

Les travaux de thèse présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans cette problématique. L'étude d'un agrosystème dans les conditions d'une **exposition** chronique à des rejets atmosphériques de tritium permet d'apporter des éléments de réponses. D'abord, l'étude de la tritiation de **cultivars** permet de considérer l'influence de l'espèce et de la localisation sur l'intégration du tritium et d'étudier les éventuels effets isotopiques au sein des composants d'un même échantillon. Le suivi de cheptels bovins, dont l'alimentation et l'abreuvement sont

essentiellement issus de l'environnement proche, permet de comparer les activités absorbées et celles excrétées dans le lait. L'étude de la tritiation du lait permet également de voir si des différences existent entre les principaux composants organiques.

Compte tenu des difficultés propres à la mesure du tritium, l'aspect méthodologique et métrologique revêt une importance particulière pour s'assurer de la précision et de la pertinence nécessaires à cette étude.







## **Partie 2. Matériel et méthodes**

Afin de pouvoir apporter des éléments de réponse aux questions soulevées dans la bibliographie, il est nécessaire de s'assurer que les mesures faites sont justes. En effet, compte tenu de l'**ubiquité** et de la grande mobilité du tritium, on peut supposer que la réalisation d'une étude environnementale à Valduc pourrait s'accompagner de biais importants dans nos mesures. Il est donc nécessaire de s'assurer que les méthodes mises en œuvre permettent de s'affranchir d'éventuels biais lors des mesures. Après avoir décrit les méthodes de préparation des échantillons et de mesure du tritium utilisées au cours de l'étude, nous aborderons les méthodes employées pour l'évaluation de la pertinence de celles apparues particulièrement importantes. L'étude environnementale sera ensuite décrite.

La mesure du tritium dans les échantillons doit s'affranchir de deux difficultés : la faible énergie du **rayonnement  $\beta$**  émis et la multiplicité des formes que peut prendre le tritium dans une matrice biologique. Les méthodes décrites ci-dessous permettent d'étudier le tritium dans tous les compartiments environnementaux.

# **1. Descriptions des techniques analytiques**

## **1.1. La mesure du tritium**

### **1.1.1. Le comptage par scintillation liquide**

L'activité volumique tritium de l'essentiel des échantillons a été mesurée par comptage en scintillation liquide, utilisant un **tricarbotrimètre** PerkinElmer Tri-Carb 2910 TR. Le liquide scintillant utilisé durant cette étude a été l'Ultimagold LLT de Packard.

Le terme « quenching » regroupe l'ensemble des phénomènes physico-chimiques qui diminuent l'efficacité lumineuse du scintillateur. Bien que tous les comptages durant la thèse aient été réalisés sur de l'eau (distillée et neutralisée quand nécessaire), un phénomène de quenching subsiste et a dû être pris en compte lors des mesures. Cela est rendu possible par l'établissement d'une courbe de quenching spécifique au détecteur, au liquide scintillant utilisé ainsi qu'au volume du mélange échantillon-liquide scintillant (géométrie). Cette courbe

de quenching établit une relation entre le rendement de détection des photomultiplicateurs et l'affaiblissement lumineux. Dans les pratiques du Laboratoire de Métrologie et de Surveillance de l'Environnement, cette courbe de quenching est établie chaque année afin de corriger des éventuelles baisses de rendements des photomultiplicateurs.

Chaque semaine, et tel que préconisé dans le document technique du constructeur du **tricarbotrimètre**, une série de trois standards est passée afin de contrôler le bon fonctionnement des photomultiplicateurs en rendement et en bruit de fond. Le rendement tritium sur le **tricarbotrimètre** utilisé au cours de la thèse ne s'est jamais écarté de plus de 1,5 % de la valeur mesurée au moment de l'établissement de la courbe de quenching. En complément, un bruit de fond est mesuré et vérifié chaque semaine à l'aide d'un mélange de 10 mL d'eau de Vignolle (activité volumique  $< 1 \text{ Bq.L}^{-1}$ ) et de 10 mL de liquide scintillant

Compte tenu de l'activité volumique de nos échantillons (entre  $< 5,8 \text{ Bq. L}^{-1}$  et jusqu'à  $300 \text{ Bq.L}^{-1}$ ), 10 mL d'eau sont mélangés à 10 mL de liquide scintillant dans un flacon de polyéthylène antistatique. Le mélange est opéré jusqu'à l'obtention d'un milieu homogène. L'échantillon ainsi préparé est ensuite placé dans le **tricarbotrimètre** au moins 2 h avant le début de la mesure afin de limiter le risque de luminescence parasite.

Lorsque le volume d'échantillon n'est pas suffisant, l'échantillon est placé dans un flacon de 20 mL dont la masse est préalablement tarée. La masse de l'échantillon est alors mesurée puis l'échantillon est complété par de l'eau de Vignolle jusqu'à avoir 10 g d'eau. La fin de la préparation de la mesure se déroule alors comme décrit ci-dessus.

Avant la mesure de chaque série d'échantillons, une préparation de 10 mL d'eau de Vignolle et 10 mL liquide scintillant est comptée avant chaque série d'échantillon. Le taux de comptage correspondant est utilisé comme bruit de fond et déduit de l'activité volumique mesurée sur les échantillons.

### 1.1.2. Détermination de l'activité volumique de l'eau

L'activité volumique de l'échantillon, l'incertitude qui lui est associée ainsi que le seuil de détection et la limite de détection sont déterminés à partir des conditions du comptage, des paramètres propres au **tricarbotrimètre** et au liquide scintillant et des impulsions dénombrées par les photomultiplicateurs à partir des formules qui suivent.

- **Activité volumique**

$$A = \frac{N - Bdf}{t_c \times Rdt_d \times pe \times C} \quad (3)$$

avec :

- $A$  : activité volumique (en Bq L<sup>-1</sup>),
- $N$  : nombre d'impulsions totales brutes,
- $Bdf$  : nombre d'impulsions de bruit de fond,
- $t_c$  : durée de comptage (en s),
- $Rdt_d$  : rendement de détection,
- $pe$  : prise d'essai (en L),
- $C$  : facteur de correction (dilution, distillation...).

- **Incertitude relative :**

$$U(A)_{rel} = k \times \sqrt{\frac{N + Bdf}{(N - Bdf)^2} + \underbrace{u(Rdt_d)_{rel}^2 + u(pe)_{rel}^2 + u(C)_{rel}^2}_{u_{rel}^2}} \quad (4)$$

avec :

- $U(X)_{rel}$  : incertitude relative élargie du paramètre  $X$ ,
- $A$  : activité volumique (en Bq L<sup>-1</sup>),
- $k$  : facteur d'élargissement
- $N$  : nombre d'impulsions totales brutes,
- $Bdf$  : nombre d'impulsions de bruit de fond,
- $Rdt_d$  : rendement de détection,
- $pe$  : prise d'essai (en L),
- $C$  : facteur de correction (dilution, distillation...),
- $u_{rel}$  : incertitude relative systématique.

- Seuil de décision,

$$A_{SD} = k_{1-\alpha} \times \frac{\sqrt{2 \times Bdf}}{t_c \times Rdt_d \times pe \times C} \quad (5)$$

avec :

- $A_{SD}$  : seuil de décision (en Bq L<sup>-1</sup>),
- $k$  : facteur d'élargissement
- $\alpha$  : risque de première espèce
- $Bdf$  : nombre d'impulsions de bruit de fond,
- $t_c$  : durée de comptage (en s),
- $Rdt_d$  : rendement de détection,
- $pe$  : prise d'essai (en L),
- $C$  : facteur de correction (dilution, distillation...).

- Limite de détection

$$A_{LD} = \frac{2 \times A_{SD} + k_{1-\beta}^2 \times \frac{1}{t_c \times Rdt_d \times pe \times C}}{1 - k_{1-\beta}^2 \times u_{rel}^2} \quad (6)$$

avec :

- $A_{LD}$  : limite de détection (en Bq L<sup>-1</sup>),
- $A_{SD}$  : seuil de décision (en Bq L<sup>-1</sup>),
- $k$  : facteur d'élargissement
- $\beta$  : risque de 2<sup>ème</sup> espèce
- $t_c$  : durée de comptage (en s),
- $Rdt_d$  : rendement de détection,
- $pe$  : prise d'essai (en L),
- $C$  : facteur de correction (dilution, distillation...),
- $u_{rel}$  : incertitude relative systématique.

### 1.1.3. L'oxydation catalytique

#### 1.1.3.1 Méthode usuelle

Généralement, la mesure du **TOLt** ou du **TOLne** de nos échantillons est réalisée à partir de la combustion et de l'**oxydation catalytique** de la matière sèche ayant subi ou non un **rinçage isotopique** préalable.

Le four utilisé est composé de deux fours tubulaires traversés par un tube en quartz. La première unité chauffante est mobile et permet ainsi d'optimiser la combustion de l'échantillon. Au niveau du deuxième four (fixe), le tube de quartz est rempli d'un mélange d'oxyde de cobalt (10-15 % en masse) et de silice (85-90 % en masse) agissant comme un **catalyseur d'oxydation** afin d'éliminer les impuretés (notamment les composés soufrés). La température des deux fours est généralement comprise entre 800 °C et 900 °C, la température du four fixe étant au moins égale à celle du four mobile.

Pendant son utilisation, le tube en quartz est balayé par un flux de dioxygène pur qui a une double fonction : permettre la combustion et l'**oxydation** complète de l'échantillon et être le vecteur des produits formés. La première extrémité du four permet l'insertion de l'échantillon et son retrait une fois l'opération achevée. Un tube en U en quartz est connecté à l'autre extrémité du four. Les gaz y circulent et passent ainsi dans un piège froid (éthanol à -35°C). L'eau formée lors de combustion et de l'**oxydation catalytique** se condense alors sur les parois du tube en U.

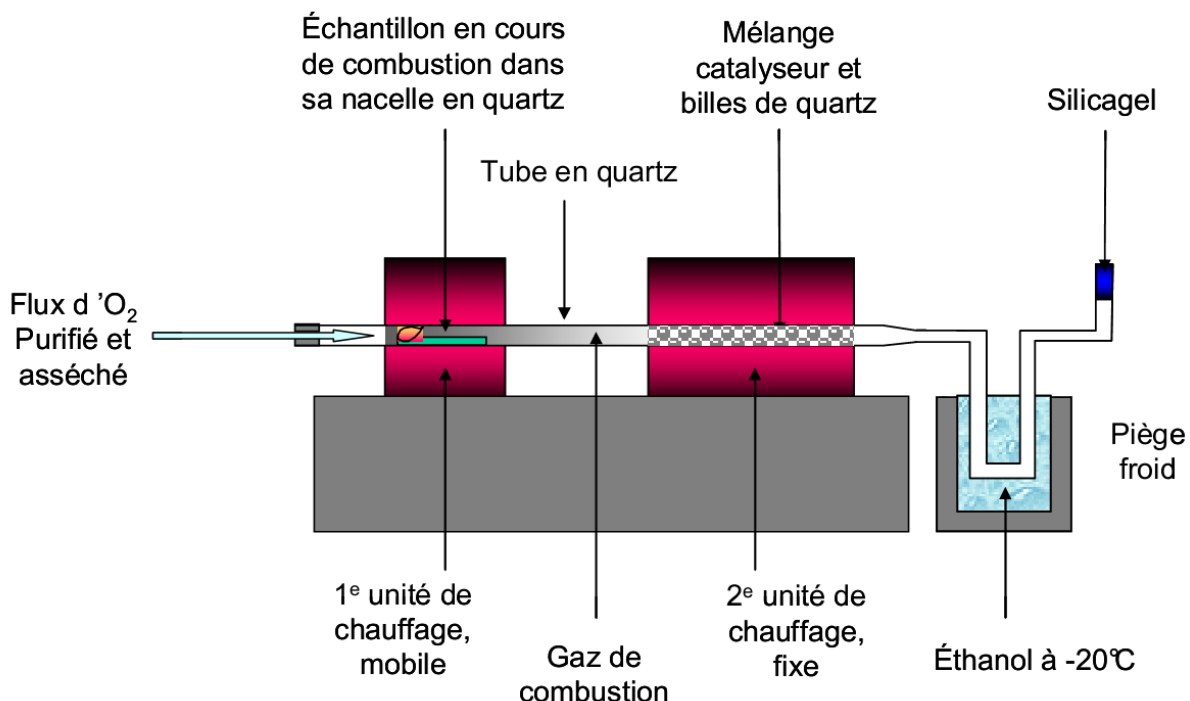


Figure 2-1 : Représentation schématique du dispositif d'extraction du tritium organiquement lié (Boyer, 2009)



Dans la mesure du possible, au moins 15 g d'échantillon sont placés dans une nacelle en quartz préalablement tarée. La masse brute de l'ensemble est alors mesurée. Le tube en U est également taré avant le début de la combustion. Une fois que ce dernier est connecté au four et que la circulation du dioxygène est mise en place, l'échantillon peut être inséré entre les deux unités chauffantes et l'extrémité par laquelle il est entré peut être fermée à l'aide d'un bouchon en caoutchouc. L'ajustement du four mobile au cours de la combustion permet à cette dernière d'être à la fois rapide, régulière et complète.

La nacelle en quartz est retirée du four une fois que la combustion est terminée. Sa masse brute est mesurée pour connaître la masse de cendres restantes. Le tube en U est également retiré et sa masse brute est mesurée afin de connaître la quantité d'eau produite au cours de la combustion. Une fois la glace fondue, l'eau de combustion est récupérée afin d'être neutralisée (son pH est de l'ordre de 1 à 2 à la sortie du four) puis distillée (pour réduire au maximum le quenching) avant que son activité volumique soit mesurée par scintillation liquide.

Entre chaque combustion, 5 à 10 g de coton très faiblement tritié sont brûlés dans le four afin de réduire le risque d'effet mémoire. Un **blanc** de manipulation est réalisé en « brûlant » une quinzaine de grammes d'eau de référence dans les conditions normales d'utilisation du four. Ce **blanc** est déduit de l'activité volumique mesurée sur l'eau de combustion.

Dans les conditions normales d'utilisation, les rendements mesurés sur le four sont de l'ordre de 98-99 % (Boyer, 2009). Ces données concordent avec les comparaisons faites entre nos données expérimentales et les valeurs théoriques de teneur en hydrogène de nos échantillons trouvées dans la bibliographie. On peut noter que cette évaluation est essentiellement utile soit pour vérifier un bon rendement de l'opération dans son ensemble, soit pour permettre la conversion  $\text{Bq L}^{-1}$  d'eau de combustion à  $\text{Bq kg}^{-1}$  de matière fraîche ou sèche selon la nature de l'échantillon traité. La plupart de nos résultats sont présentés sous d'activité volumique d'eau de combustion afin de faciliter les comparaisons entre rapports isotopiques.

### 1.1.3.2 Autre traitement de l'eau de combustion

Le traitement de l'eau de combustion (neutralisation et distillation) est très consommateur de temps. Afin de réduire le temps de traitement et permettre ainsi le traitement d'un plus grand nombre d'échantillons, une méthode alternative a été développée au cours de la thèse.

Une fois l'eau récupérée, du charbon actif est ajouté à l'eau de combustion. Le contact est maintenu, si possible sous agitation modéré, jusqu'à ce que la phase liquide soit limpide. Le tout est alors filtré sous pression réduite sur un filtre en verre fritté muni d'un filtre hydrophobe. Le filtrat est récupéré et son pH est neutralisé mais avec une plage de tolérance plus large : pH entre 4 et 9.

Deux biais sont craints dans cette méthode :

- la présence de chimiluminescence du fait de composés non-adsorbés par le charbon actif ;
- un rendement de comptage faible du fait d'une dégradation du liquide scintillant par le pH trop acide ou par un quenching dû à des molécules non adsorbés par le charbon actif.

Afin de tester ces deux hypothèses, 3 combustions d'environ 60 g de sucre non-tritié sont réalisées. 3 aliquotes de chaque échantillon sont alors prélevées. La première est traitée selon la méthode usuelle (neutralisation puis distillation). Du charbon actif est mélangé aux deux autres aliquotes. Le mélange est filtré le lendemain. La deuxième aliquote est mélangée au liquide scintillant sans avoir été préalablement neutralisé (pH proche de 1), alors que le pH de la troisième aliquote est porté autour de 4 par ajout de  $\text{Na}_2\text{O}_2$ . Les activités volumiques mesurées sont comparées entre elles avec une attention particulière pour la chimiluminescence et le rendement.

Pour compléter ces essais, 6 eaux de combustions de nos échantillons (choisies sur le critère de leur volume, devant être au moins de 20 mL) ont été divisés en 2 aliquotes : une pour être traitée de façon usuelle, l'autre pour être traitée selon la méthode développée, avec un ajustement du pH modéré.

#### 1.1.4. Détermination de l'activité massique de l'échantillon par spectrométrie de masse $^3\text{He}$

Afin de pouvoir mesurer l'activité tritium sur des très faibles masses d'échantillons environnementaux, la mesure par **spectrométrie** de masse  $^3\text{He}$  a été également utilisée. Les échantillons destinés à cette mesure ont alors été envoyés au LSCE (CEA-CNRS-UVSQ, Gif-sur-Yvette, France) pour leur traitement (Jean-Baptiste *et al.*, 2010).

La préparation des échantillons suit d'abord celle nécessaire à une mesure « classique » du **TOLt** ou du **TOLne**. Les échantillons secs sont alors broyés très finement afin de pouvoir être introduits à travers une canne en verre de 3/8 de pouce dans une ampoule de 100 mL. La canne et l'ampoule sont en verre à faible diffusivité hélium (Corning 1724). Elles sont préalablement tarées. Une fois l'échantillon en place, l'ampoule le contenant est fixée à un banc de mise sous vide permettant d'atteindre une pression  $<10^{-5}$  hPa. L'ampoule est alors scellée à la flamme. Sa masse est à nouveau mesurée pour connaître la masse précise d'échantillon introduit dans l'ampoule. Elle est ensuite stockée à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (pour limiter encore la diffusivité de l'hélium) pendant la durée établie en fonction de la masse de l'échantillon et de son activité massique estimée. Une fois cette durée révolue, l'ampoule est connectée à un **spectromètre** de masse (MAP-215 noble gas mass spectrometer) pour mesurer la quantité de  $^3\text{He}$  qui a été produite durant la période de stockage par la décroissance du tritium.

La limite de détection régulièrement atteinte par cette équipe est de 0,15 pour un échantillon de 20 g équivalent eau et une période de stockage de 3 mois. La masse de l'échantillon et/ou la période de stockage peuvent être augmentées au besoin. Ainsi, compte tenu de la gamme d'activité de nos échantillons (20-30 Bq  $\text{kg}^{-1}$  équivalent eau), une masse d'échantillon inférieure au gramme et un stockage de 3 mois sont suffisants pour une mesure avec une incertitude adéquate.

## 1.2. Préparation des échantillons - Généralités

Une des difficultés dans l'étude du tritium tient de l'**ubiquité** de l'hydrogène et à la grande mobilité de certaines de ses fractions (eau libre et **TOLe**). Les conditions de stockage, de

préparation et de mesures ont fait l'objet d'une partie de l'étude afin de mettre en place les conditions optimales à l'obtention de mesures pertinentes lors de l'étude environnementale.

### 1.2.1. Stockage des échantillons

L'eau de Volvic est une eau de source considérée comme ayant une très faible activité tritium. Elle est régulièrement utilisée par des laboratoires pour réaliser des **blancs** de mesure. Afin de vérifier que le stockage d'échantillons à Valduc n'induit pas un marquage sensible, des échantillons de Volvic ont été stockés dans différentes conditions et leur activité volumique a été mesurée après 6 h, 16 h, 24 h, 48 h, 96 h, 1 semaine, 2 semaines, 3 semaines et 4 semaines de stockage.

Deux paramètres de stockage ont été testés : la température et le type de flacon utilisé pour le stockage.

4 séries de 9 échantillons de 50 mL d'eau de Volvic ont été stockées dans des flacons en polyéthylène de 150 mL à -25°C, 3°C, 20°C et 40°C.

5 autres séries de 9 échantillons d'eau de Volvic ont été stockées dans différents types de flacons :

- 50 mL d'eau de Volvic dans des flacons en polyéthylène haute densité (PEHD) de 150 mL,
- 150 mL d'eau de Volvic dans ces flacons,
- 50 mL d'eau de Volvic dans ces mêmes flacons introduits dans des pochettes vinyles thermoscellées,
- 20 mL d'eau de Volvic dans des flacons de verre de 20 mL,
- 20 mL d'eau de Volvic dans des flacons de PEHD utilisés pour le comptage par scintillation liquide.

1 L d'eau de Volvic a été également stocké dans une bouteille de 1,5 L maintenue ouverte. 10 mL y ont été prélevés après 8h, 16 h, 24 h, 48 h, 96 h, 1 semaine et 2 semaines. La durée de cette expérience a été plus courte que les autres car, du fait de la prise d'échantillons et de l'évaporation, il n'y avait plus d'eau dans le flacon après 2 semaines de stockage.

Les résultats présentés sont les moyennes de 4 répétitions.

### 1.2.2. Déshydratation

La comparaison des activités volumiques mesurées sur l'eau libre extraite de différentes aliquotes d'un même lait a mis en évidence des différences significatives. Celles-ci ont justifié une étude de leurs origines afin de s'assurer de la pertinence des protocoles utilisés au cours de l'étude (pas d'intercontamination ou d'effet « mémoire » de la verrerie et des appareils utilisés, absence de fuite, bons rendements d'extraction et de récupération des fractions séparées, etc.). Les hypothèses testées sont l'influence de la technique d'extraction d'eau et de ses conditions de réalisation, l'influence de la masse initiale de l'échantillon et l'influence du taux de déshydratation final.

#### 1.2.2.1 Influence de la technique utilisée

Trois techniques d'extraction d'eau courantes ont été comparées par paire :

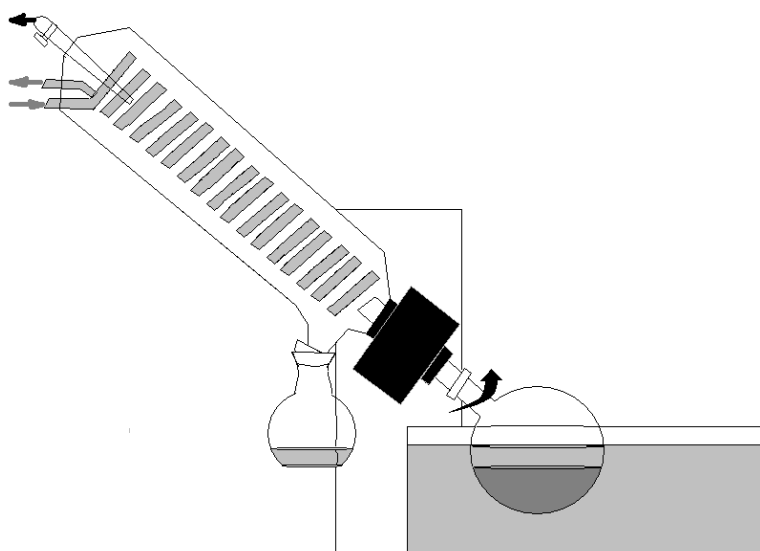
- la distillation sous pression réduite en utilisant un pont de distillation équipé d'un réfrigérant de Liebig de 25 cm de long,
- la distillation sous pression réduite en utilisant un évaporateur rotatif (Buchi Rotavapor R200 ou Buchi Rotavapor RE 121 équipé d'un bain d'huile Buchi 471 Oil bath),
- la **lyophilisation** en utilisant un Heto Drywinner PL 3000.

Les échantillons appariés étaient de masse équivalente pour chacune des répétitions opérées.

Pour la première technique testée, l'échantillon est introduit dans une Erlenmeyer d'1 L placé dans un bain-marie thermostaté à 55 °C. Une ampoule anti-mousse est connectée à l'Erlenmeyer afin de limiter ou au moins ralentir la progression du lait dans le montage lors des phases où l'échantillon est le plus volubile. Les vapeurs sont condensées dans un pont de distillation équipé d'un réfrigérant de Liebig de 25 cm dans lequel circulait une eau thermostatée à 3 °C. Le volume mort du pont de distillation est estimé à 0.69 mL  $\pm$  0.25 mL. Le pont de distillation est connecté à une pompe Vacuubrand ME 2C fonctionnant à plein régime. Le distillat est récupéré dans un Erlenmeyer placé dans un bain-marie également

thermostaté à 3 °C. A la fin de l'extraction, la température du premier bain-marie est montée à 70 °C afin de s'assurer que l'extraction d'eau est complète.

La distillation sous pression réduite est également conduite en utilisant un évaporateur rotatif (**Figure 2-2**). Cette technique diffère de celle décrite plus haut essentiellement par le montage utilisé. Une différence majeure entre les deux techniques est notamment la géométrie du réfrigérant puisque l'évaporateur rotatif est équipé d'un réfrigérant à spirale dont le volume mort est estimé à environ 7 mL. Les échantillons étaient placés dans un ballon d'1 L connecté à l'évaporateur rotatif et plongé dans un bain-marie thermostaté à 55 °C. Les vapeurs sont condensées dans le réfrigérant dans lequel circule une eau thermostatée, comme précédemment, à 3 °C. Le distillat est connecté dans un ballon à fond plat. A la fin de l'extraction, la température du bain-marie est poussée à 70°C.



**Figure 2-2 : Schéma d'un évaporateur rotatif**

La **lyophilisation** est conduite dans un **lyophilisateur** Heto Drywinner PL 3000 modifié par l'utilisation d'un insert en verre (**Figure 2-3**). Les échantillons sont placés dans des pots en acrylique connectés à un manifold dont l'extrémité plonge dans l'insert en verre. Celui-ci est introduit dans le piège froid du **lyophilisateur** (température : -55 °C) afin de faciliter la récupération de l'eau extraite ainsi que la décontamination du piège froid entre deux utilisations et limiter ainsi l'effet mémoire. Le manifold est connecté à une pompe à vide Adixen Pascal 1005 fonctionnant à plein régime. La pression dans le système est < 5 hPa.

Après la déshydratation complète de l'échantillon, l'insert en verre est immédiatement et hermétiquement fermé pour éviter le marquage de l'eau condensée par la vapeur d'eau atmosphérique jusqu'à ce que le verre soit complètement réchauffé et que la glace ait fondue.

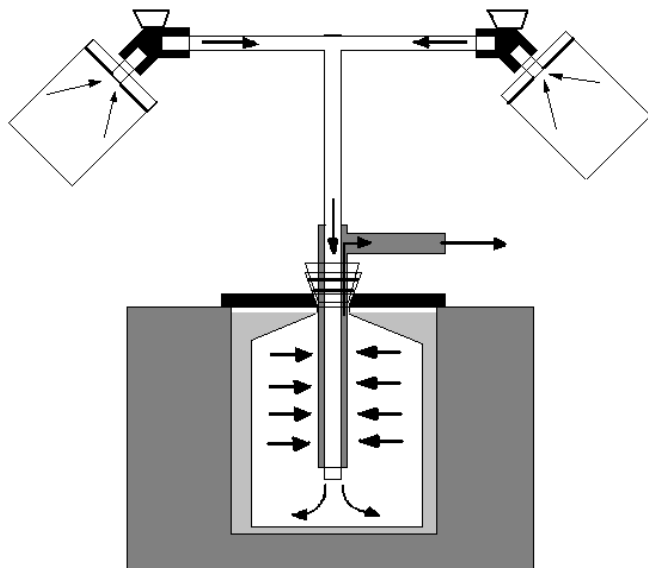


Figure 2-3 : Schéma de fonctionnement du lyophilisateur Heto Drywinner PL 3000 modifié par l'utilisation d'un insert en verre dans le piège froid

Les techniques de déshydratation sont comparées par paire afin d'optimiser la puissance des tests statistiques utilisés (9 répétitions pour comparer la **lyophilisation** et la distillation par évaporateur rotatif, 8 pour comparer **lyophilisation** et distillation par pont de distillation et 8 pour comparer les deux techniques de distillation).

#### 1.2.2.2 Test de la fiabilité de la lyophilisation et de la distillation

L'activité volumique d'une eau pure tritiée (eau de type 3 produite par une unité de purification d'eau RiOs 3 Merck Millipore) est mesurée dans 3 situations :

- sans autre traitement
- après avoir été distillée sous pression réduite en utilisant un pont de distillation (comme décrit plus haut)
- après avoir été lyophilisée dans les conditions décrites plus haut.

Pour chaque situation, 3 aliquotes de  $49,9 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  ont été préparées.

### 1.2.2.3 Influence de l'air ambiant sur la lyophilisation

Afin de détecter d'éventuelles sources de marquage externe, deux types d'expériences ont été menées.

#### 1.2.2.3.1 Lyophilisation à Valduc et à Besançon

L'activité volumique de l'eau extraite par **lyophilisation** d'aliquotes d'un même lait est mesurée selon que la **lyophilisation** soit opérée à Valduc (dans les conditions décrites plus haut) ou à Besançon où l'activité tritium de la vapeur atmosphérique est en-dessous de notre seuil de décision.

7 aliquotes de  $51,2 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$  sont préparées à partir d'un même échantillon de lait dans des flacons en polyéthylène de 150 mL. Elles sont congelées à  $-25^\circ \text{C}$  à Valduc après être chacune insérée dans une pochette vinyle doublement scellée. Trois sont lyophilisées à Valduc, trois à Besançon et une est distillée sous pression réduite à l'aide d'un pont de distillation.

La **lyophilisation** à Besançon est faite à l'aide d'un Cosmos 20k (Cryotec). Le vide est assuré par une pompe Adixen Pascal 2005-Ci fonctionnant à pleine capacité. A la fin de la **lyophilisation**, une fois le vide cassé, l'eau condensée est récupérée en chauffant le condenseur.

L'activité volumique de chacun des échantillons est mesurée à Valduc dans les conditions décrites plus haut.

#### 1.2.2.3.2 Lyophilisation à vide

Trois **lyophilisations** sont menées à Valduc en utilisant un Drywinner Heto PL 3000 pendant 5 à 7 jours. Pendant la dernière répétition, l'air ambiant est prélevé en continu à l'aide d'un **barboteur** (MARC 7000, SDEC) afin de mesurer l'activité volumique de l'eau de l'air. La masse de l'insert en verre est mesurée au début et à la fin de chaque répétition. Pour récupérer les éventuelles traces d'eau condensée, 10 mL d'eau de Vignolle sont mis au contact des



parois de l'insert puis récupérés pour en mesurer l'activité volumique et déduire ainsi l'activité volumique de l'eau condensée au cours de la **lyophilisation**. Cette activité volumique peut être comparée à celle de l'atmosphère durant la **lyophilisation**.

#### 1.2.2.4 Influence de la masse de l'échantillon

Afin de mesurer l'influence de la masse d'échantillon traité sur la fiabilité de la mesure, 6 séries d'échantillons de masses différentes (environ 15 g, 30 g, 60 g, 120 g, 240 g et 480 g) sont traitées par les deux techniques de distillation sous pression réduite précédemment décrites. La plupart des séries sont composées de 2 répétitions opérées avec le pont de distillation et une avec l'évaporateur rotatif. La série d'échantillons de 30-38 g est composée de 3 répétitions supplémentaires opérées à l'évaporateur rotatif. La masse d'échantillon la plus élevée n'a pu être testée qu'une seule fois car toutes les autres répétitions ont été avortées suite à la remontée brutale de lait dans l'ensemble du montage. Le lait utilisé pour cette expérience a ainsi fini par manquer.

#### 1.2.2.5 Influence du niveau de déshydratation final

La masse de chaque échantillon traité est comparée à la masse de matière sèche restant après la déshydratation et à la masse d'eau extraite. L'activité volumique de l'eau extraite est mesurée pour chaque échantillon. La corrélation entre le taux d'eau extraite et l'activité volumique mesurée peut ainsi être évaluée.

Des distillations séquencées sont mises en œuvre. Le montage utilisé pour ces expériences est illustré par la **Figure 2-4**. Un échantillon d'environ 300 mL est introduit dans un Erlenmeyer d'1 L placé dans un bain-marie thermostaté à 55 °C. Une ampoule anti-mousse est placée au-dessus de l'Erlenmeyer afin de limiter et de ralentir les remontées de lait le long du montage au cours de la distillation. Lorsque le système est sous pression réduite, les vapeurs circulent le long du montage jusqu'à un réfrigérant à spirale dans lequel circule une eau thermostatée à 3 °C et dont le sommet est connecté à une pompe (Vacuubrand ME 2C) qui fonctionne à plein régime. Les vapeurs condensées tombent dans une ampoule de coulée. Tous les 10-30 mL (23 mL en moyenne), l'ampoule de coulée est ouverte afin de laisser couler l'aliquote dans un

Erlenmeyer de 50 mL. Une fois vide, l'ampoule de coulée est à nouveau fermée pour recueillir l'aliquote suivante. Le vide est alors cassé au niveau de l'Erlenmeyer de 50 mL sans que cela ne perturbe le reste du système et l'aliquote est prélevée et pesée. Une fois la distillation semblant achevée, la matière sèche était lyophilisée pour récupérer l'eau qui aurait pu subsister. L'activité volumique de chaque aliquote a été mesurée.

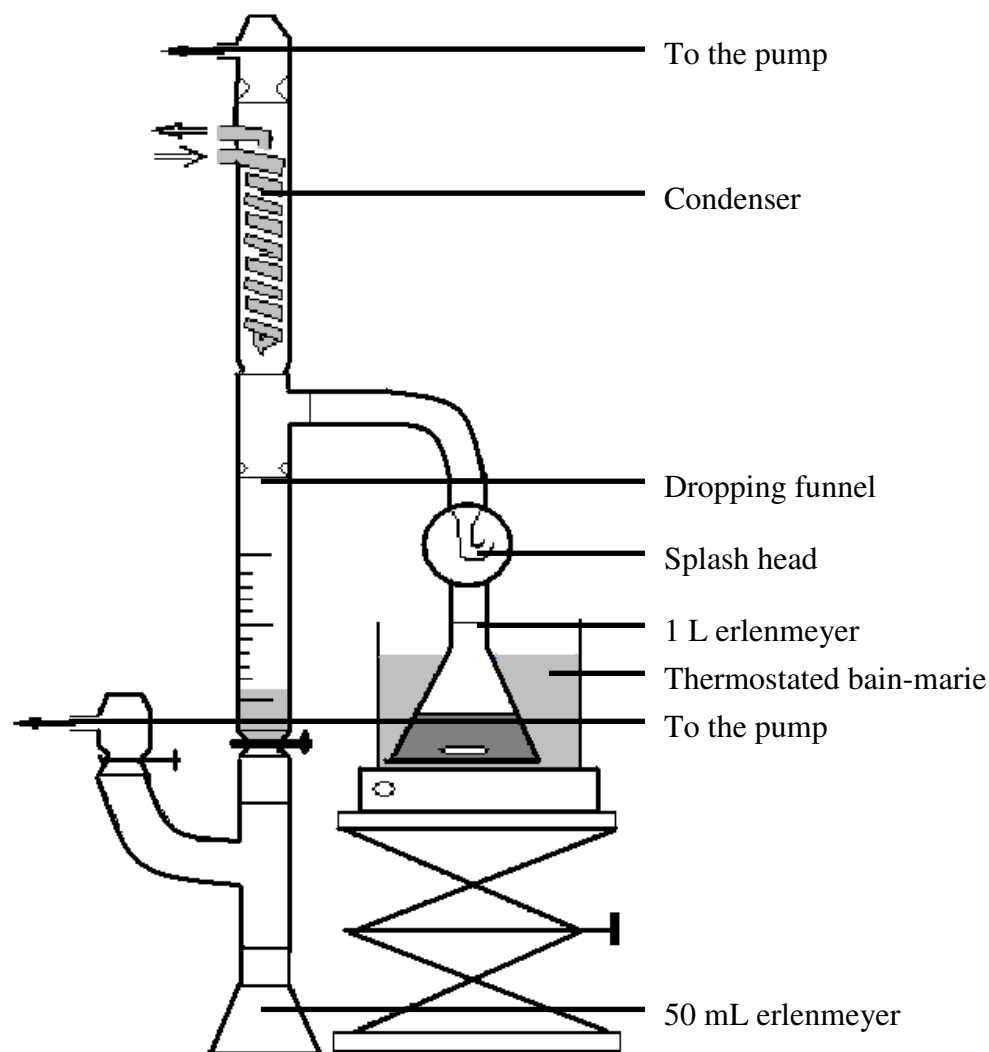


Figure 2-4: Schematic diagrams of the apparatus used for "sequential distillations"

La distillation séquentielle est mise en œuvre sur différents laits, notamment ceux collectés dans le cadre des mesures de routine du laboratoire.

### 1.2.3. Rinçage isotopique

Afin de mesurer le **TOLne**, la matière sèche de l'échantillon considéré doit être « lavée » du **TOLe** qu'elle contient. Le principe de ce lavage consiste, quelle que soit la mise en œuvre, à une mise en équilibre isotopique de la fraction échangeable de l'hydrogène de la matière sèche de l'échantillon avec grande quantité d'eau non-tritiée : on dilue ainsi le **TOLe** jusqu'à ce qu'il ne soit plus perceptible.

Une fois l'échantillon frais broyé et lyophilisé, il est mélangé à une grande quantité d'eau de référence (10 fois la masse de l'échantillon sec). Le temps de contact est d'au moins 48h à température ambiante et sous agitation magnétique. L'eau est ensuite extraite du mélange (par **lyophilisation** ou distillation). L'activité massique du **TOLne** est mesurée sur la matière sèche ainsi préparée. L'activité volumique de l'eau d'échange est également mesurée pour vérifier qu'elle est inférieure à la limite de détection. Si ce n'est pas le cas, un deuxième **rinçage isotopique** est réalisé.

## 1.3. Préparation des échantillons - Particularités

### 1.3.1. Traitement du lait

Afin de mesurer l'activité tritium dans les principaux composants organiques du lait (**matière grasse, caséines, protéines sériques et lactose**), ces-derniers sont séparés selon deux processus : la première mise en œuvre à Valduc et reposant sur la précipitation acide des caséines, l'autre mise en œuvre à la plateforme technologique de l'UMR STLO (Sciences et Technologies du Lait et des Œufs) de l'INRA de Rennes et utilisant une succession de filtrations membranaires.

#### 1.3.1.1 Première voie de séparation

Le lait entier cru est d'abord centrifugé 30 minutes à 4700 tours min<sup>-1</sup>. La crème est ainsi séparée du lait écrémé. La crème est collectée puis déshydratée.

Le pH du lait écrémé est ensuite porté à un  $\text{pH} < 4,6$  par adjonction d'acide chlorhydrique  $10 \text{ mol L}^{-1}$  sous agitation magnétique. Le lait acidifié est alors à nouveau centrifugé à  $4500 \text{ tours min}^{-1}$  pendant au moins 10 minutes et ce jusqu'à l'obtention d'une phase aqueuse limpide. Le lactosérum acide est ainsi séparé des **caséines** précipitées. Les **caséines** sont alors collectées pour être déshydratées.

Compte tenu de difficultés rencontrées pour extraire des **protéines sériques** par précipitation, le lactosérum acide est également déshydraté sans autre traitement : il est d'abord concentré par évaporateur rotatif puis le concentré est lyophilisé. La fraction organique de la matière sèche est alors essentiellement composée de **lactose** (environ  $48 \text{ g L}^{-1}$ ) et de **protéines sériques** ( $5-7 \text{ g L}^{-1}$ ).

Ces différentes étapes sont testées sur du lait très faiblement tritié. Cette expérience a permis de vérifier l'absence de marquage des fractions produites au cours des différentes étapes de séparation lorsqu'elles sont conduites à Valduc.

#### 1.3.1.2 Séparation par filtrations membranaires

La **Figure 2-5** présente le schéma technologique proposé par l'UMR STLO pour la séparation des principaux constituants organiques du lait.

Le lait entier cru est d'abord porté à  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  avant de séparer la crème du lait écrémé par écrémage centrifuge. Le lait écrémé est alors épuré par microfiltration tangentielle (seuil de coupure  $1.0 \text{ }\mu\text{m}$ ) : les bactéries présentes dans le lait sont concentrées dans le retentat (R 1.0) alors que le filtrat (MF 1.0) est un lait écrémé épuré bactériologiquement propre.

Le MF 1.0 est alors traité par microfiltration tangentielle (seuil de coupure  $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ ) ce qui permet de concentrer les micelles de **caséines** dans leur forme native dans le retentat (R 0.1) alors que le filtrat (MF 0.1) en est exempt. Les deux fractions présentent les mêmes concentrations que le lait initial en protéines solubles, **lactose**, minéraux et azote non-protéique. La diafiltration de R 0.1 avec de l'eau osmosée permet de purifier le concentré de micelles de **caséines**.

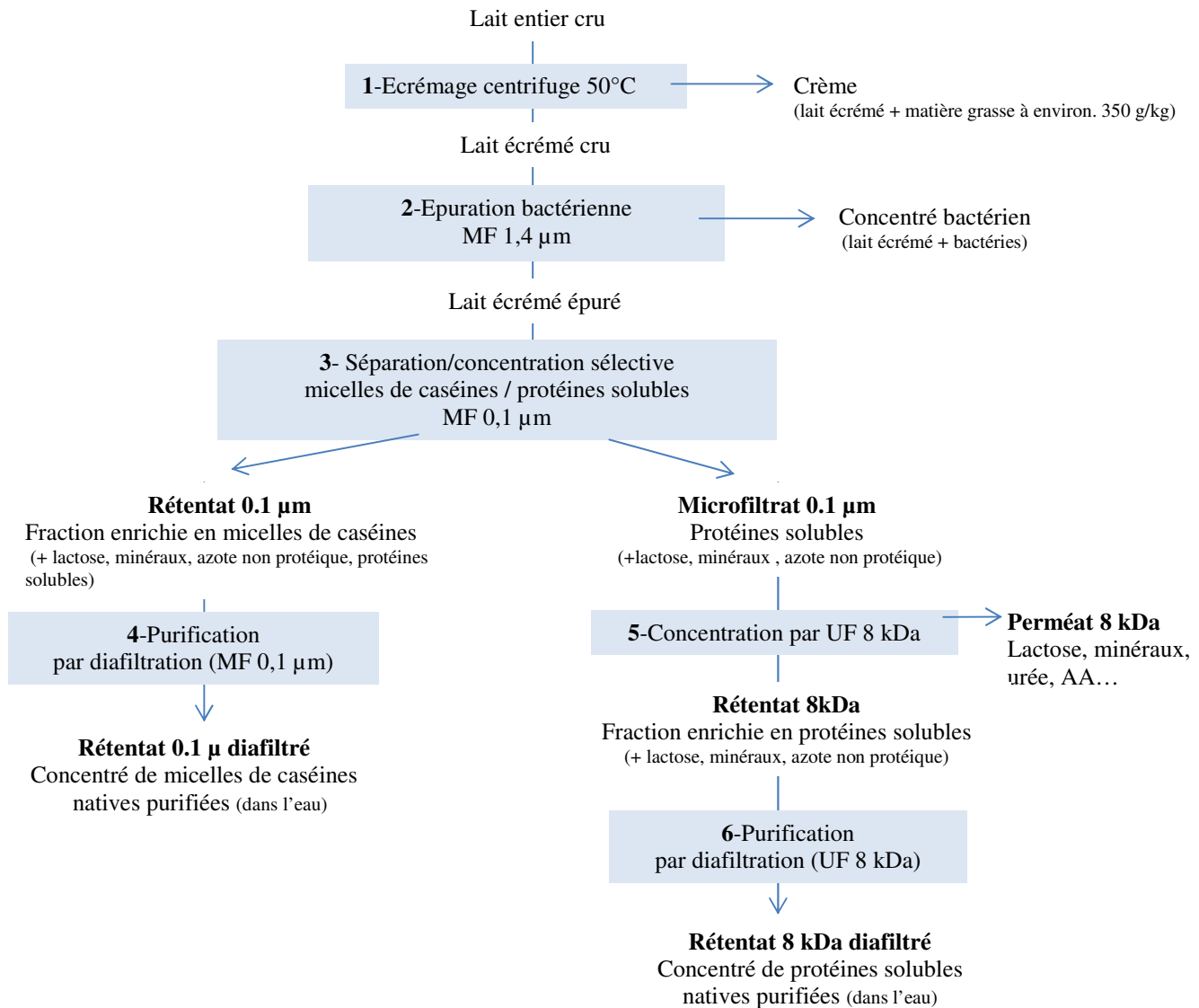


Figure 2-5: Schéma technologique de séparation des principaux constituants organiques du lait tel que proposé par l'INRA

Le MF 0.1 est alors ultrafiltré (seuil de coupure de 8 kDa) afin de concentrer les protéines solubles dans le retentat (R 8 kDa) alors que le filtrat (UF 8 kDa) contient le **lactose**, les minéraux ainsi que l'azote non protéique en concentrations équivalentes que le lait initial. Le R 8 kDa est diafiltré avec de l'eau osmosée pour purifier les protéines solubles.

Chaque opération est conduite à 50 °C pour limiter le développement bactérien et diminuer la viscosité du lait.

### 1.3.2. Extraction/séparation de nutriments végétaux

Dans le même objectif d'une plus grande précision de la connaissance de la tritiation des composantes d'une chaîne alimentaire, nous avons cherché à séparer au mieux les principaux nutriments des **cultivars**.

Des protocoles d'extraction et de purification ont été établis afin de pouvoir extraire en quantité et en qualité suffisantes les nutriments ciblés des végétaux employés.

#### 1.3.2.1 Extraction de l'amidon et du gluten d'épis de blé et d'orge

150 g de grains sont écrasés afin d'obtenir une pâte homogène. Celle-ci est mélangée à 500 mL d'eau faiblement tritiée jusqu'à ce que le mélange soit homogène. Ce dernier est alors tamisé à 500  $\mu\text{m}$ . L'amidon, dissout dans la phase aqueuse, passe à travers le tamis, le gluten reste avec le retentat. Le tamisat est ensuite centrifugé à 4500 tours  $\text{min}^{-1}$  et à 10 °C pendant 45 minutes. La phase solide est récupérée puis lyophilisée. Elle peut ensuite être brûlée pour la mesure du **TOLne** de l'amidon.

Le retentat obtenu lors du tamisage est d'abord lavé à l'eau distillée faiblement tritiée puis filtrée. L'opération est renouvelée jusqu'à ce que le filtrat demeure incolore. Le retentat est ensuite lyophilisé. Le résidu sec peut alors être brûlé pour mesurer le **TOLne**.

#### 1.3.2.2 Extraction de l'huile de colza

Les graines de colza sont d'abord extraites des **siliques** à pleine maturité. Les **siliques** sont finement broyées et conservées pour mesurer leur activité tritium. Les graines sont également broyées finement puis mélangées à 5 fois leur masse de cyclohexane. Le tout est chauffé à reflux à une température de 60 °C sous agitation mécanique pendant 30 minutes. Une fois refroidi, le mélange est filtré sur buschner. Les graines sont rincées avec un volume de cyclohexane. Le filtrat est transvasé dans une ampoule à décanter. On y ajoute environ 3 volumes de solution saturée en NaCl. On laisse décanter. La phase organique est récupérée puis séchée avec du sulfate de magnésium anhydre. Le tout est filtré grossièrement, le filtrat étant récupéré dans un ballon de distillation. On procède alors à une distillation pour extraire le cyclohexane. L'huile de colza est récupérée pour les mesures de son activité tritium.

### 1.3.3. Mesure du tritium atmosphérique

Dans le cadre du suivi régulier du site ainsi que dans certaines expériences conduites au cours de la thèse, l'activité en tritium atmosphérique a été suivie de façon hebdomadaire par **barbotage**. Cette méthode repose sur la capture du tritium atmosphérique par de l'eau faiblement tritiée. L'air atmosphérique est prélevé à débit constant et diffuse successivement dans deux séries de deux flacons remplis d'eau faiblement tritiée (eau de Volvic). La première série piège la vapeur d'eau par affinité chimique. Entre les deux séries, l'air traverse un four à **catalyse** maintenu à une température de 450 °C qui permet d'oxyder en eau l'hydrogène présent dans l'air sous d'autres formes (notamment H<sub>2</sub> et CH<sub>4</sub>). L'eau ainsi formée peut être piégée par la deuxième série de flacons. L'évaporation de l'eau dans les flacons est limitée par leur maintien à basse température (environ 5 °C).

Connaissant le volume d'air prélevé au cours de la période de mesure, le volume d'eau et son activité volumique dans chaque flacon, il est possible de connaître l'activité volumique de l'air en HTO et autres formes de tritium.

Les **barboteurs** utilisés au cours de l'étude sont des MARC 7000 fournis par SDEC. Le constructeur donne un rendement pour ces systèmes de 99 % ± 7% pour le piégeage de HTO et de 98 % ± 7% pour la conversion en HTO dans le four **catalytique**.

Les moyens visant à déterminer l'activité tritium des différents types d'échantillons étant décrits, intéressons-nous à la méthode employée pour étudier la tritiation de l'environnement dans le voisinage proche du centre de Valduc.

## **2. Etude environnementale de marquage chronique au tritium**

### **2.1.Choix de la chaîne alimentaire**

Compte tenu de la localisation du site de Valduc et des caractéristiques de ses émissions de tritium (uniquement atmosphériques), les recherches ont été orientées vers la tritiation d'un écosystème terrestre.

Afin de pouvoir mesurer et suivre l'influence de différents paramètres en conditions environnementales, le suivi d'exploitations d'élevages laitiers présente de nombreux avantages. Compte tenu de la diversité de leur alimentation et la facilité de prélever celui-ci, les cheptels bovins sont choisis comme dernier maillon de la chaîne alimentaire étudiée. Ce choix est également justifié par la facilité de prélèvement et donc de suivi du lait dans le temps ainsi que par l'importance de cet aliment dans la nutrition humaine (AFNOR, 2001c).

Outre le suivi des cheptels, des mesures sont également faites sur des végétaux cultivés dans l'environnement de Valduc. La pertinence de ce choix tient dans le fait que ces végétaux entrent dans la chaîne alimentaire qui mène à l'homme soit directement (blé) soit indirectement par la consommation animale (comme pour le maïs par exemple) (AFNOR, 2000).

Quatre exploitations laitières sont situées au Nord, au Sud-Est, au Sud-Ouest et au Nord-Ouest du site, entre 4,5 et 6,5 km de Valduc. Au-delà, outre la moins grande accessibilité, le niveau de tritiation aurait été trop bas pour permettre des mesures avec une incertitude satisfaisante.



## 2.2. Suivi environnemental du site de Valduc

Dans le cadre de la surveillance du site de Valduc, de nombreux paramètres environnementaux sont mesurés régulièrement. L'étude environnementale présentée ici s'est appuyée sur des données produites dans ce cadre.

### 2.2.1. Données météorologiques

La température, l'hygrométrie relative, la pression atmosphérique, la direction et la vitesse des vents (à 10 m, 30 m et 50 m au-dessus du site) ainsi que la pluviométrie sont suivis en permanence sur le site de Valduc. Les données sont collectées et archivées en temps réel.

Les équipements permettant ces mesures sont :

- un thermomètre Pullsonic PT100-4fils
- un thermohygromètre Skye
- une sonde température et humidité Presto 635
- une sonde de pression Vaisala PTB220BAA2A1
- une girouette skye Alliance technology Vector Instruments W200P-D1
- un anémomètre skye Alliance technology Vector Instruments A100R
- 2 anémomètres à ultrasons GILL windObserver II
- un sodar Remtech PA0
- un pluviomètre Lambrecht 15188
- un pluviomètre skye Environmental Instriments Ltd. ARG 100.

### 2.2.2. Suivi de l'activité tritium de l'environnement

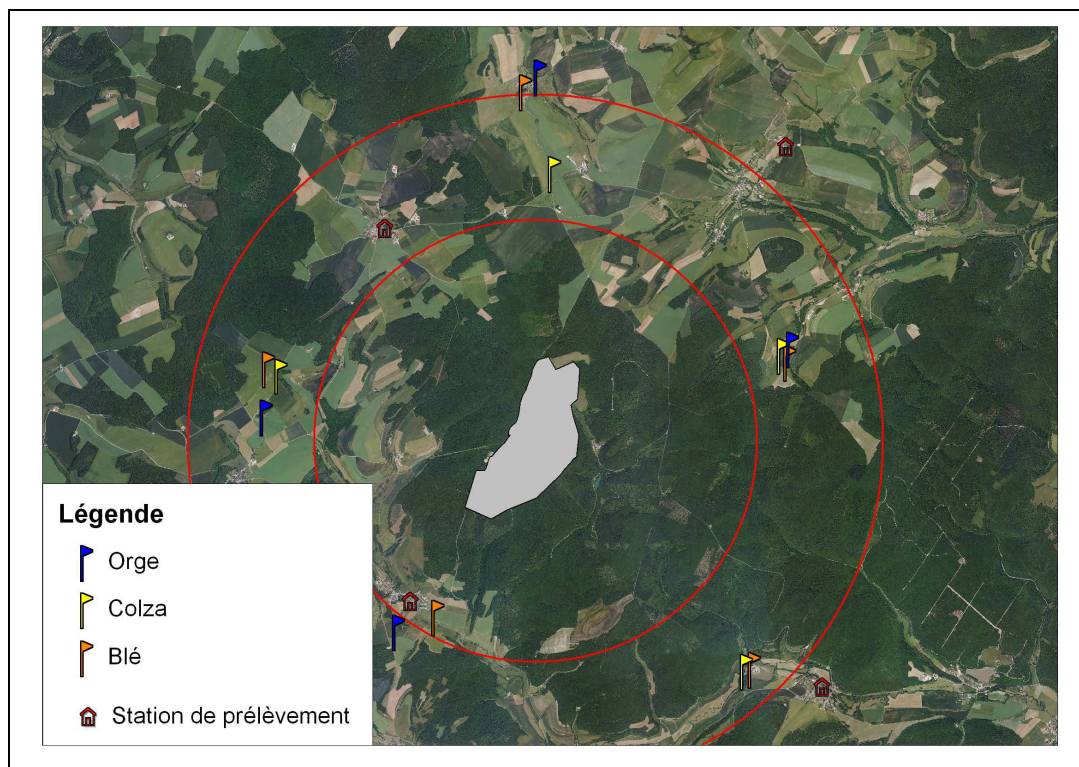
4 stations de surveillance environnementales sont réparties autour du site, dans les villages de Salives, Moloy, Léry et Echalot. Elles sont toutes équipées d'un **barboteur** MARC 7000 SDEC (voir la section 1.3.3 pour plus de détails). Les flacons sont relevés hebdomadairement.

## 2.3. Tritiation des végétaux en conditions environnementale

Deux séries de mesures sont conduites : l'une pour évaluer les différences d'intégration du tritium liées entre espèces et l'incidence de la localisation sur la tritiation, l'autre pour suivre la tritiation de **cultivars** au cours de leur croissance.

### 2.3.1. Influence de la localisation et de l'espèce

Les conditions d'exposition des plantes durant leur croissance aux rejets atmosphériques de Valduc varient en fonction de leur lieu de culture. C'est un paramètre majeur dont nous avons cherché préciser l'influence.



Carte 1 : Carte de situation des prélèvements de la première campagne de mesures

La première campagne est composée de trois espèces choisies afin d'avoir des périodes de croissance et de maturité comparables : le blé d'hiver, l'orge de printemps et le colza. 5 zones de prélèvements sont définies afin d'être réparties autour du site et éloignées de distances équivalentes du site (toutes situées entre 3,7 km et 5,8 km). Les points de prélèvements sont sélectionnés afin de minimiser la distance entre les points d'une même zone.

L'ensemble de ces échantillons a été prélevé le 14 juin 2012. Chaque échantillon est coupé à environ 5 cm au-dessus du sol, immédiatement placé dans un sachet plastique hermétiquement fermé et mis en glacière maintenue à moins de 10°C, puis rapidement reconditionné en pochette vinyle thermo-scellée pour être stocké à -20°C jusqu'à son traitement.

Le traitement des échantillons consiste d'abord en un premier broyage suivi d'une congélation. L'échantillon broyé est alors lyophilisé jusqu'à ce que sa masse soit constante. Afin de parfaire la granulométrie des échantillons, ils pouvaient être broyés à nouveau une fois secs.

Le **TOLt** et le **TOLne** sont mesurés suivant la technique décrite à la section 1.1.3.

Les plantes prélevées sont coupées 5 cm au-dessus du sol. Compte tenu de la taille de ces échantillons, ils n'ont pas été mis en sachet hermétique avant leur broyage. Il est donc choisi de ne mesurer que le **TOLne** sur ces échantillons. Une fois les échantillons collectés, ils ont été stockés à 5°C avant leur broyage.

Une fois broyés, les échantillons ont été placés en pochettes vinyle thermo-scellées. Les différents organes d'un prélèvement ont été regroupés dans une deuxième pochette vinyle également scellée avant d'être congelés à < -20°C.

Le **TOLne** a été mesuré conformément à la méthode décrite à la section 1.1.3 après un **rinçage isotopique** effectué selon la méthode décrite à la section 1.2.3.

### 2.3.2. Tritiation au cours de la croissance

Afin d'étudier la tritiation des **cultivars** en conditions d'**exposition** chronique, des points de prélèvement sont définis autour des stations de prélèvements environnementaux de Valduc. Les échantillons sont prélevés hebdomadairement entre le 15 avril 2013 et le 16 juillet 2013 (AFNOR, 2001b).

La masse moyenne des échantillons est évaluée par la pesée de 10 individus de chaque prélèvement. A partir du 27/05/2013, les individus étant de taille suffisante, les épis sont pesés et traités séparément de la tige et des feuilles.

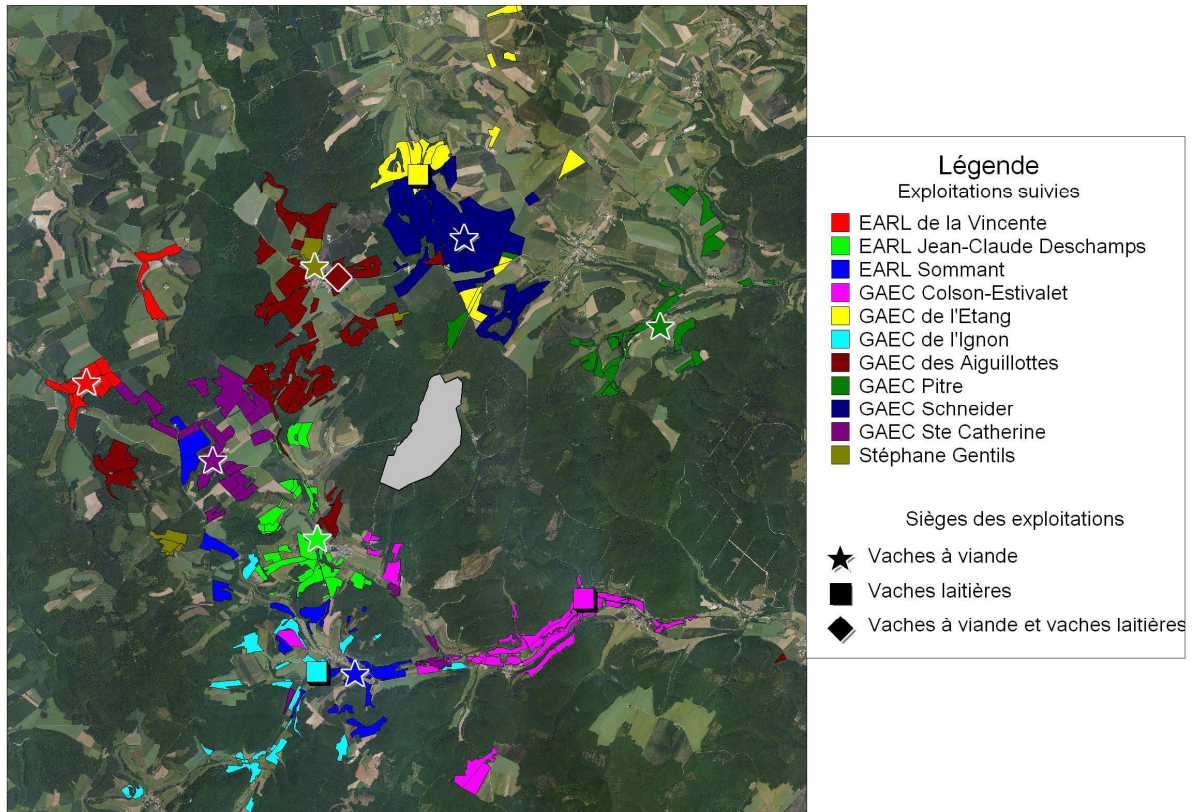
Le tritium total et le **TOLne** sont évalués sur chaque prélèvement. Les variations de ces activités tritium sont comparées aux activités atmosphériques mesurées hebdomadairement dans les stations de prélèvements et à l'évolution de la biomasse au cours du temps.

## **2.4. Tritiation des animaux en conditions environnementales**

### **2.4.1. Caractérisation des exploitations**

Au début de la thèse (18/10/2010), 12 élevages sont exploités dans un rayon inférieur à 10 km autour du site de Valduc : 9 élevant des races bovines à viandes (vaches charolaises) et 4 élevant des vaches laitières (Prim'Holstein, Montbéliardes et Brunes des Alpes). Une exploitation agricole a cessé l'élevage au cours de la thèse.

Au début de la thèse, 11 exploitants (7 élevant des races à viande, 4 élevant des races laitières et 1 produisant lait et viande) ont été rencontrés afin de connaître les conditions d'élevage susceptibles d'impacter la tritiation des cheptels (Carte 2). Ensuite, chaque année la cartographie des produits cultivés par chaque exploitation a été actualisée afin de savoir où sont produites les céréales susceptibles d'entrer dans l'alimentation des animaux suivis.



Carte 2 : Carte des exploitations agricoles

#### 2.4.2. Comparaison de la tritiation de laits de différentes exploitations

3 campagnes de prélèvements de lait sont menées au cours de la thèse afin de comparer la tritiation des laits produits par les 4 exploitations laitières voisines de Valduc. Lors de chaque campagne, les laits des 4 exploitations (dans la mesure du possible) sont prélevés au cours de la même matinée.

Les laits ainsi collectés sont traités selon la première voie de séparation des constituants organiques du lait décrite précédemment.

L'activité tritium est comparée entre les différentes fractions organiques des laits ainsi qu'aux différents autres paramètres environnementaux suivis.

### 2.4.3. Suivi d'une exploitation dans le temps

En complément des comparaisons entre exploitations, une exploitation fait l'objet d'un suivi hebdomadaire pendant 16 semaines.

Pendant cette période, un **barboteur** installé dans l'étable prélève en continu l'atmosphère dans laquelle évolue le cheptel. Lors de chaque relevé du **barboteur**, du lait est collecté ainsi que l'alimentation « prête à consommer » et l'eau d'abreuvement.

L'évolution de l'activité tritium de ces différents paramètres est suivie.

L'ensemble des méthodes employées au cours de l'étude ont été décrites et justifiées. Voyons quels ont été les résultats obtenus au cours de la thèse.







# **Partie 3. Vers une plus juste évaluation du marquage tritium**

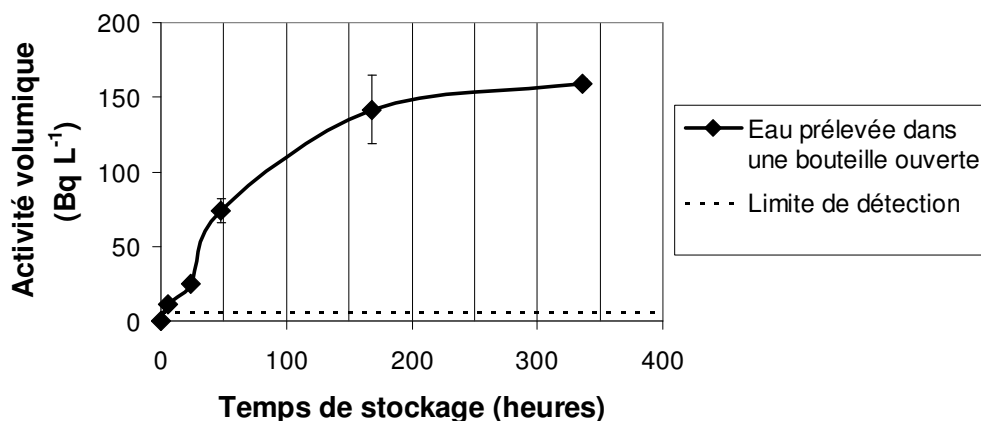
Compte tenu de l'**ubiquité** du tritium et de sa très grande mobilité, la gestion des échantillons du prélèvement jusqu'à la mesure ainsi que la séparation des différentes fractions nécessitent un grand soin afin de garantir la justesse des résultats. Cette première partie de résultats présente ceux qui ont permis de consolider les modes opératoires employés au cours de l'étude environnementale et ceux qui ont contribué à améliorer notre représentation du tritium dans les différents compartiments environnementaux, permettant ainsi d'aborder le fractionnement isotopique de manière plus juste.

Une fois l'échantillon prélevé, le stockage est la première source de biais potentielle. C'est donc logiquement le premier point abordé par l'étude.

## 1. Stockage des échantillons

La capacité du tritium à diffuser à travers différents matériaux est connue (Okada et Momoshima, 1993). Il est donc nécessaire de vérifier que le stockage des échantillons dans une ambiance tritiée ne risque pas d'aboutir à un marquage sensible.

Durant les 2 mois pendant lesquels nos tests sont effectués, seules les répétitions faites sur de l'eau de Volvic contenue dans un flacon ouvert ont montré une évolution significative de l'activité volumique de l'échantillon au cours du temps. Ces résultats sont représentés sur la **Figure 3-1**. L'activité volumique de l'eau évolue selon une sigmoïde dont le plateau se situe proche de l'équilibre avec l'activité volumique de la vapeur d'eau atmosphérique ( $178,5 \pm 133,0 \text{ Bq L}^{-1}$ ).



**Figure 3-1 : Variation de l'activité volumique de l'eau de Volvic contenue dans un flacon ouvert au cours du temps**

Les résultats des autres expériences restent en-dessous du seuil de décision ( $2,8 \text{ Bq L}^{-1}$ ) durant la durée de l'expérience. Des échantillons ont été conservés pendant 2 ans après la fin du suivi régulier et leur activité volumique a été mesurée. Sur 5 échantillons, 4 présentent une activité volumique moyenne de  $7,1 \text{ Bq L}^{-1}$  (de  $5,0 \text{ Bq L}^{-1}$  à  $9,3 \text{ Bq L}^{-1}$ ). L'activité volumique mesurée sur le dernier échantillon est en revanche nettement supérieure :  $95,5 \text{ Bq L}^{-1}$ . L'incohérence de cette dernière valeur par rapport aux 4 autres est confirmée par le test de Dixon. On peut donc envisager que cette valeur ait été obtenue par une perturbation de l'expérience (comme un bouchon insuffisamment serré pour garantir l'herméticité du flacon).

Ces résultats confirment la capacité de stocker des échantillons à Valduc, mais à conditions de respecter des règles simples pour garantir la validité des résultats :

- une durée de stockage raisonnable, et aussi courte que possible
- un flacon hermétique et correctement bouché.

Ces conditions suffisent pour éviter le marquage d'un échantillon même dans les conditions particulières d'activité atmosphérique du centre de Valduc. Cependant, et malgré ce constat, il est choisi de procéder durant l'étude à un double flaconnage (flacon + pochette vinyle doublement scellée ou 2 pochettes vinyles doublement scellées imbriquées) afin de doubler les précautions quant au risque de marquage tritium et de conserver les échantillons à  $< -20^{\circ}\text{C}$  dans le but de préserver l'intégrité des échantillons au cours de leur stockage. Enfin, les échantillons sont traités aussi rapidement que possible afin de limiter le temps entre le prélèvement (ou la préparation) et l'analyse des résultats.

S'étant assuré que le stockage (pour une durée raisonnable) des échantillons à Valduc n'était pas à même d'induire une modification sensible de leur activité volumique, nous avons également vérifié que nos méthodes de préparation d'échantillon n'avaient pas plus d'impact sur la justesse de nos mesures.

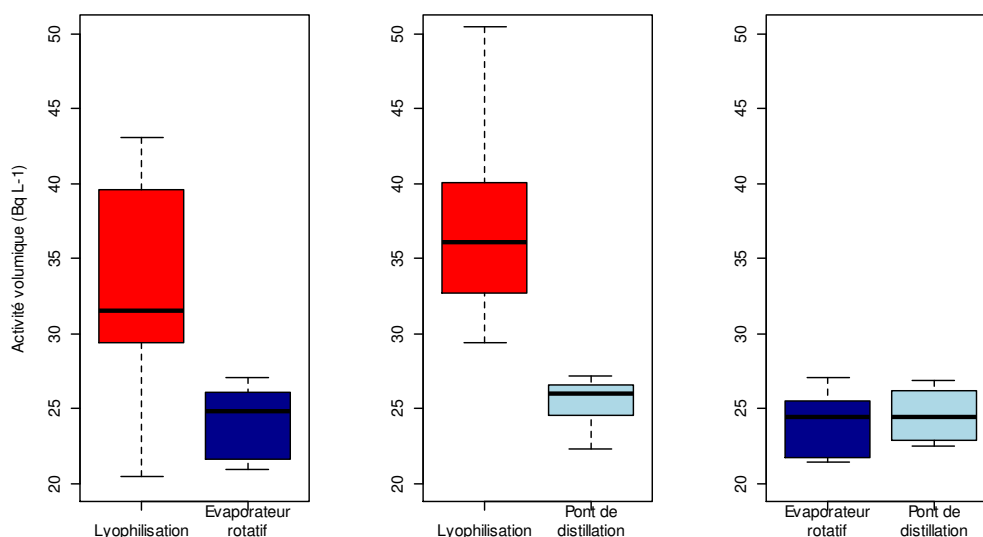
## 2. Déshydratation

La comparaison de l'activité volumique de l'eau extraite de différentes aliquotes d'un même lait a mis en évidence des différences significatives. Des expériences sont réalisées pour identifier l'origine (ou les origines) de ces différences, d'en comprendre les mécanismes et ainsi de mettre en place des protocoles pertinents pour l'extraction de l'eau des échantillons.

### 2.1. Influence de la technique de déshydratation

#### 2.1.1. Comparaison de techniques usuelles

Des répétitions sont faites afin de comparer les activités volumiques de l'eau extraite du lait par différentes techniques (**lyophilisation**, distillation par évaporateur rotatif ou utilisant un pont de distillation sous pression réduite). La masse moyenne des échantillons sur lesquels sont procédées ces répétitions est de 60,4 g. Les répétitions sont opérées sur deux techniques en parallèle. La **Figure 3-2** montre comment les résultats obtenus sont distribués.



**Figure 3-2 : Comparaison de la distribution des activités volumiques mesurées sur l'eau libre extraite par chacune des 3 techniques de déshydratations étudiées**

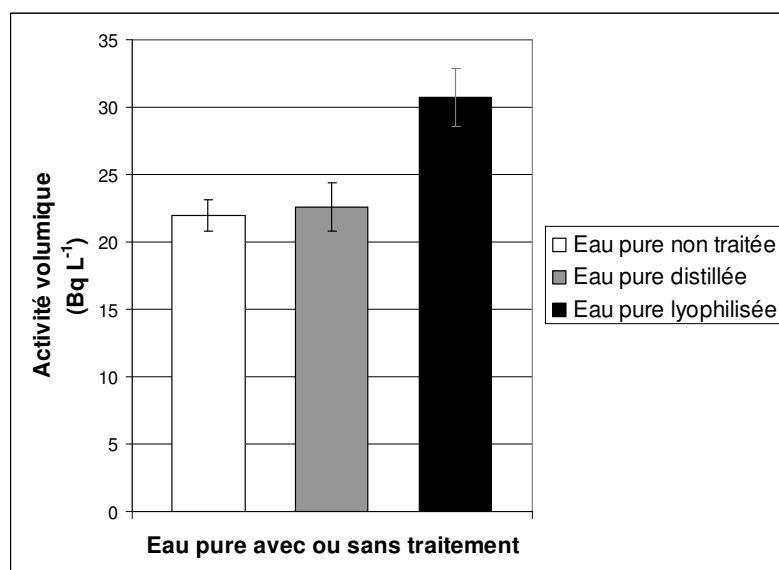
Le rectangle central représente les valeurs comprises entre les quartiles inférieur et supérieur. La ligne horizontale médiane représente la valeur médiane de chaque distribution. Les lignes verticales s'étendent de la valeur minimale à la valeur maximale de chaque population

L'activité volumique de l'eau extraite par lyophilisation est significativement plus élevée que celle des eaux extraites par les deux techniques de distillation (test de Wilcoxon,  $p < 0.01$ ). La différence entre les deux techniques de distillation n'est pas significative.

Ces résultats montrent que les deux techniques de distillation donnent des résultats proches, sans différence significative malgré une dispersion apparemment plus importante (écart type supérieur de 22 %) pour les distillations opérées par l'évaporateur rotatif. En revanche, l'activité volumique de l'eau extraite par **lyophilisation** est significativement supérieure à celle de l'eau extraite par distillation et présente une dispersion bien plus importante.

### 2.1.2. Comparaison des fiabilités de la distillation et de la lyophilisation

L'activité volumique d'une eau pure tritiée est mesurée après ou sans traitement complémentaire (distillation ou **lyophilisation**). La **Figure 3-3** présente les résultats des différentes répétitions.



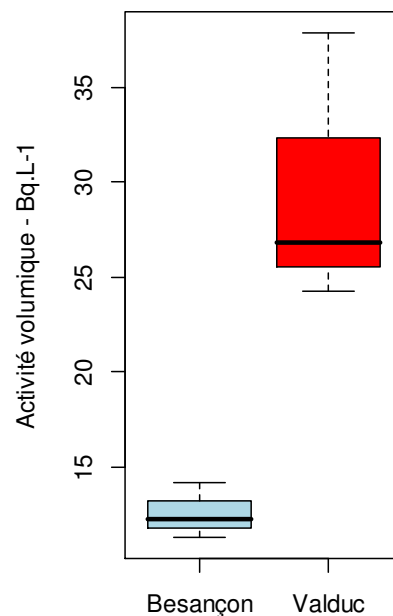
**Figure 3-3 :** Comparaison de l'activité volumique mesurée sur une eau pure tritiée après ou sans traitement complémentaire (distillation ou **lyophilisation**)

On observe que la distillation n'a pas d'incidence sur l'activité volumique mesurée (+ 2,9 %) alors que la **lyophilisation** induit une nette augmentation de l'activité volumique (+ 42,9 %).

### 2.1.3. Influence de l'ambiance sur la lyophilisation

#### 2.1.3.1 Lyophilisation à Valduc et à Besançon

Il est d'abord procédé à la **lyophilisation** de deux groupes de trois aliquotes de 50 g extraits d'un même échantillon de lait, un à Besançon et l'autre à Valduc. Toutes les **lyophilisations** sont menées à leur terme : environ 88 % de leur masse est extraite en eau, sans différence significative entre les échantillons (écart-type : 0.09 %). Pourtant, la comparaison des activités volumiques mesurées sur l'eau extraite des deux groupes de **lyophilisation** montre d'importantes différences (**Figure 3-4**).



**Figure 3-4 : Activité volumique de l'eau libre du lait extraite par lyophilisation à Besançon et à Valduc**

Ces différences peuvent uniquement s'expliquer par le marquage et par le démarquage de l'eau extraite au cours des **lyophilisations** par la vapeur d'eau atmosphérique ambiante. Ce phénomène peut avoir lieu au cours de trois étapes :

- avant la **lyophilisation** par condensation de la vapeur d'eau atmosphérique contenue dans le système pendant sa mise à température
- pendant la **lyophilisation** à cause d'une fuite ou d'une désorption des joints du système utilisé sous l'effet du vide
- après la **lyophilisation**, lorsque le vide est cassé, par condensation de l'air entrant dans le système alors que le piège froid est encore à sa température de fonctionnement.

On note que la différence entre l'activité volumique attendue de l'eau libre du lait (autour de  $20 \text{ Bq L}^{-1}$ ) et l'activité volumique mesurée sur l'eau extraite à Besançon est importante. Compte tenu de la faible différence d'activité entre l'eau libre et l'eau atmosphérique de Besançon, cela montre qu'il y a eu d'importants échanges entre ces deux compartiments (de l'ordre de 15 g d'eau mis en jeu). Cependant, l'appareil utilisé ne permet pas d'avoir une mesure précise des quantités d'eau condensée sur le piège froid et donc d'estimer les contributions d'une condensation « parasite » sur le piège froid et des échanges au cours de la récupération de l'eau condensée.

Le système de **lyophilisation** utilisé à Valduc limite ces risques par l'emploi d'un insert en verre plongé dans le piège froid qui permet d'isoler l'eau condensée de l'atmosphère au cours de sa fonte et d'empêcher ainsi les échanges au cours de cette étape. Cela permet de comprendre que les différences entre les activités attendues et mesurées à la suite de la **lyophilisation** à Valduc ou à Besançon soient du même ordre de grandeur alors que l'activité tritium atmosphérique de Valduc est supérieure de près d'un ordre de grandeur à celle de l'eau extraite. Ainsi, les laboratoires dont les systèmes de **lyophilisation** ont les mêmes caractéristiques que ceux de Valduc (par exemple petits pièges froids facilement isolables de l'ambiance) et/ou qui ont une activité atmosphérique du même ordre de grandeur que l'eau libre extraite au cours de leur **lyophilisation** n'observeront pas de déviation de cette amplitude, celle-ci pouvant même être inférieure à l'incertitude de mesure.

#### 2.1.3.2 Lyophilisation à vide

Trois **lyophilisations** à vide sont opérées à Valduc sur une durée de 5 à 7 jours. La masse d'eau condensée ainsi que son activité volumique sont mesurées et présentées dans le **Tableau 3-1**.

**Tableau 3-1 : Masse et activité volumique de l'eau condensée lors de lyophilisation à vide menées à Valduc**

Durée de la lyophilisation à vide (h)	Masse d'eau récupérée (g)	Activité volumique de l'eau récupérée ( $\text{Bq L}^{-1}$ )
168	0,4	200
168	0,0	Pas de mesure
146	0,8	257

Les résultats obtenus lors de la première et de la troisième répétition concordent avec les résultats présentés **Figure 3-2**. Par exemple, 0,8 mL d'eau parasite dont l'activité est de  $257 \text{ Bq L}^{-1}$  peut expliquer une augmentation de  $4 \text{ Bq L}^{-1}$  de l'activité volumique d'un échantillon de 47,5 mL dont l'activité volumique initiale est  $23 \text{ Bq L}^{-1}$ .

Cependant, la masse d'eau collectée lors de ces **lyophilisations** à vide apparaît variable, ainsi que son activité volumique. Cela indique que les phénomènes à l'origine de ces résultats sont intermittents, dépendant notamment des conditions atmosphériques : humidité de l'air et activité volumique de la vapeur d'eau.

L'activité volumique de la vapeur d'eau atmosphérique collectée durant la troisième **lyophilisation** est de  $90,8 \text{ Bq L}^{-1}$ , ce qui est très inférieur à l'activité volumique de l'eau condensée dans le piège froid. On peut en déduire que le phénomène à l'origine de cette eau condensée n'intègre pas l'activité au cours de la **lyophilisation** (comme le fait le **barboteur**). 4 autres mécanismes apparaissent donc comme pouvant être à l'origine de l'eau parasite :

- l'échantillon étant mis à la **lyophilisation** congelé (à  $-25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), de l'eau atmosphérique peut se condenser entre la sortie de la pochette vinyle et la mise en place dans le **lyophilisateur**
- la vapeur d'eau présente dans le volume du **lyophilisateur** (environ 6 L dans le cas du Héto Drywinner PL 3000) peut se condenser dans le piège froid entre le moment où il se met à température et le début de la **lyophilisation**
- la vapeur d'eau de l'air qui entre dans le **lyophilisateur** lorsqu'on casse le vide à la fin de la **lyophilisation** peut se condenser puisque le piège froid est toujours à sa température de fonctionnement
- des échanges entre la vapeur d'eau de l'air et l'eau extraite peuvent survenir durant la fonte de l'eau condensée et jusqu'à ce qu'on la récupère dans un flacon adapté.

Compte tenu des précautions prises à Valduc lors de la réalisation de **lyophilisation** (sortie des échantillons de la pochette vinyle juste au moment de les mettre dans le **lyophilisateur** et de lancer la **lyophilisation** et fermeture hermétique du piège froid au cours de la fonte de l'eau condensée jusqu'à sa récupération), il apparaît que les hypothèses de condensation de la



vapeur d'eau contenue dans le **lyophilisateur** avant la mise au vide et au moment où le vide est cassé sont les plus probables.

Le rendement apparent de récupération de l'eau extraite au cours de la **lyophilisation** est de l'ordre de 97 %. Il est donc impossible, hormis en réalisant une **lyophilisation** à vide, d'identifier et de mesurer la quantité d'eau parasite compte tenu des faibles masses en jeu ( $< 1$  g). Ce phénomène a ainsi pu être mis en évidence à Valduc du fait de la différence supérieure à un ordre de grandeur entre les activités volumiques de l'air ambiant et des échantillons environnementaux. Cependant, tout pousse à croire que, sans précaution supplémentaire à celles prises à Valduc, les phénomènes à l'origine des déviations observées au cours de **lyophilisation** jouent également lorsque l'activité de l'ambiance est faible, conduisant ainsi à un démarquage de l'eau extraite, bien que celle-ci puisse être dans l'incertitude de mesure.

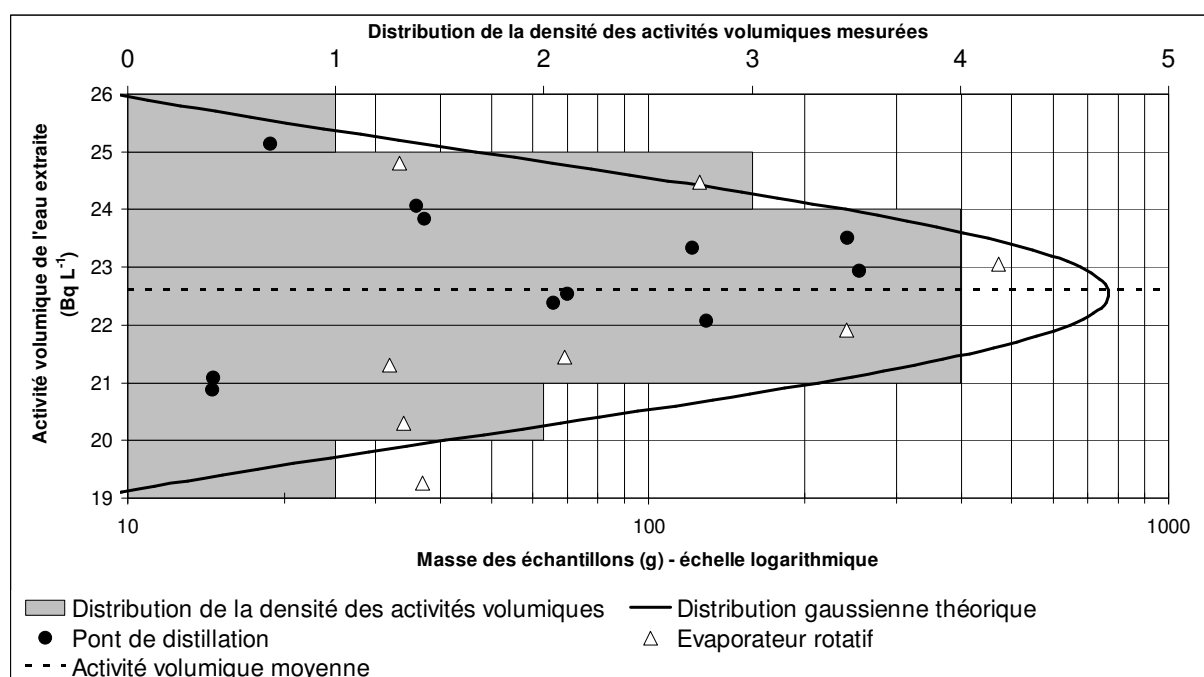
Une solution pour limiter l'effet de cette condensation parasite consiste à lyophiliser des masses d'échantillon plus importantes, diluant ainsi son effet. Une solution plus adaptée serait de purger le **lyophilisateur** avec un gaz sans vapeur d'eau ( $N_2$ , Ar, air sec, ...) lors de la mise en température du piège froid et de casser le vide avec ce même gaz. Enfin, réaliser la **lyophilisation** dans une ambiance sèche (en boîte à gants par exemple) permettrait en plus de se prémunir de l'effet de fuites ou de désorption des joints au cours de la **lyophilisation**.

## 2.2. Influence de la masse de l'échantillon

L'eau libre de 19 échantillons d'un même lait est extraite par distillation, soit en utilisant un évaporateur rotatif, soit un pont de distillation. Les résultats de cette série de répétitions sont synthétisés dans le **Tableau 9** et sont présentés dans la **Figure 3-5**. Comme attendu, l'activité volumique mesurée sur les échantillons suit une distribution gaussienne. Les incertitudes de mesures varient entre 14 % (pour les activités volumiques les plus élevées) et 17 % (pour les activités volumiques les plus faibles).

**Tableau 3-2 : Moyenne et écart-type du taux d'eau extrait et de l'activité volumique mesurée sur les différents groupes d'échantillons**

Masse fraîche des échantillons (g)	Taux d'eau extrait (%)		Activité volumique (Bq L <sup>-1</sup> )		Nombre d'échantillons
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	
14,55 - 18,848	84,99	2,02	22,4	2,40	3
30,3 - 37,196	84,12	1,79	22,3	2,28	6
65,87 - 70,163	85,11	0,65	22,1	0,59	3
122,02 - 129,414	86,04	0,34	23,3	1,20	3
240,972-254,609	86,39	1,08	22,7	0,73	3
472,403	86,28		23,1		1

**Figure 3-5 : Activité volumique de l'eau extraite en fonction de la masse de l'échantillon traité et normalité de la distribution de la densité des activités volumiques.**

L'activité volumique moyenne des petits (< 60g) et des gros échantillons (≥ 60 g) est comparable (respectivement 22,3 Bq L<sup>-1</sup> et 22,8 Bq L<sup>-1</sup>). Cependant, ces deux classes d'échantillons diffèrent par la dispersion de l'activité volumique mesurée : respectivement 2,17 et 0,88. Une partie de cette différence peut être expliquée par le taux moyen d'extraction d'eau de ces deux classes : 84,4 % et 85,9 %.

L'extraction d'eau est délicate sur les plus gros échantillons (> 120 g). En effet, dans ces conditions, le lait bout et mousse à travers l'ensemble du montage, très rapidement après le

début de la distillation. Ainsi de nombreuses répétitions ont été nécessaires pour arriver à produire les résultats présentés. Bien que le lait ait moussé également lors des distillations de petits échantillons, il était plus aisé d'employer des Erlenmeyers assez grands pour limiter l'impact de cette mousse au seul contenant de l'échantillon. L'emploi d'un Erlenmeyer d'un volume 5 fois supérieur à celui de l'échantillon a souvent été nécessaire pour se prémunir efficacement d'une contamination de l'ensemble du montage. On peut noter que ce problème n'existe pas dans la **lyophilisation** puisque l'échantillon est congelé préalablement à l'extraction d'eau.

Il semble également que les deux techniques de distillation sous pression réduite soient spécifiques à une classe de masse d'échantillon.

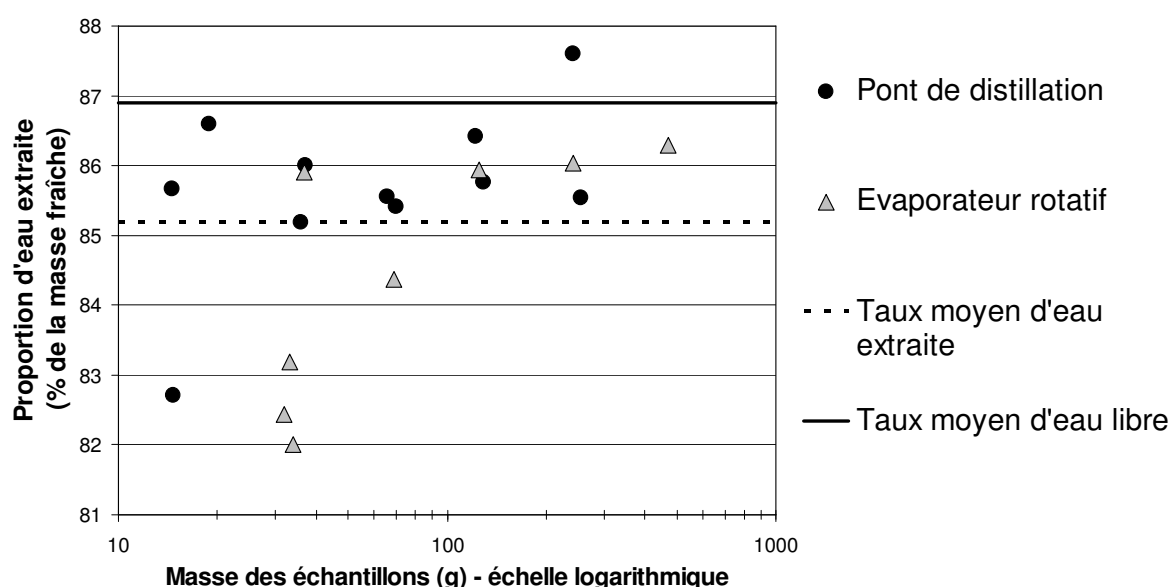


Figure 3-6 : Taux d'eau extraite en fonction de la masse fraîche d'échantillon

On peut ainsi observer sur la **Figure 3-6** que le taux d'extraction d'eau obtenu en utilisant le pont de distillation est homogène quel que soit la masse initiale de l'échantillon alors que ce même taux de déshydratation augmente de manière continue pour les échantillons traités par l'évaporateur rotatif avec l'accroissement de leur masse initiale. Seul un échantillon traité par le pont de distillation ne répond pas à ce constat et il paraît vraisemblable que ce soit lié à une erreur de manipulation (tout premier échantillon traité).

## 2.3. Influence de l'état de déshydratation

Les activités volumiques mesurées sur l'eau extraite de notre lait de référence sont comparées au niveau final de déshydratation de chaque répétition. Les résultats sont présentés **Figure 3-7**. Sur ce graphique, les activités volumiques apparaissent augmenter avec le taux de déshydratation final. Cependant, ni le test de corrélation de Spearman ni celui de Student ne permettent de conclure à une corrélation entre ces deux paramètres à partir de ces résultats.

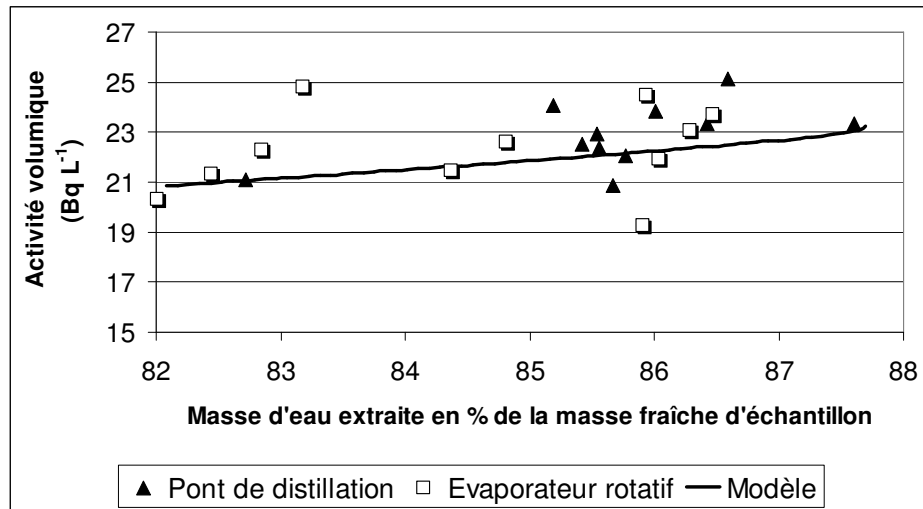


Figure 3-7 : Evolution de l'activité volumique de l'eau extraite en fonction de l'état de déshydratation

S'il y a un effet du taux de déshydratation final sur l'activité volumique de l'eau extraite, c'est qu'il y a une **discrimination isotopique** au cours de l'extraction. Dans la littérature, la discrimination isotopique au cours d'une distillation est généralement décrite par l'équation de Rayleigh. Celle-ci a été initialement établie pour la distillation d'un mélange liquide (Rayleigh et Strutt, 1902) (7).

$$\ln\left(\frac{n_0}{n}\right) = \frac{1}{\alpha - 1} \times \left( \ln\left(\frac{X_0}{X}\right) + \alpha \times \ln\left(\frac{1 - X}{1 - X_0}\right) \right) \quad (7)$$

avec :

$n_0$  : le nombre initial de moles dans l'échantillon

$n$  : le nombre de moles dans le résidu au cours de la distillation

$X_0$  : la fraction molaire initiale d'HTO dans l'échantillon

$X$  : la fraction molaire d'HTO résiduelle dans l'échantillon au cours de la distillation

$\alpha$  : le facteur de séparation isotopique

Kim and Baumgärtner (Kim et Baumgärtner, 1997) ont utilisé une autre forme de la formule de Rayleigh pour calculer l'enrichissement en tritium du résidu au cours de la distillation d'un mélange HTO/H<sub>2</sub>O (8):

$$\frac{A_r}{A_0} = \left( \frac{V_o}{V_r} \right)^{\frac{\alpha-1}{\alpha}} \quad (8)$$

avec:

$A_r$  : l'activité volumique de l'eau résiduelle

$A_0$  : l'activité volumique initiale de l'eau de l'échantillon

$V_r$  : le volume d'eau résiduel dans l'échantillon au cours de la distillation

$V_0$  : le volume d'eau initial dans l'échantillon

$\alpha$  : le facteur de séparation isotopique

Dans les conditions d'une vaporisation à l'équilibre,  $\alpha$  peut être considéré équivalent à l'effet isotopique de la pression de vapeur (VPIE pour *vapour pressure isotope effect*) qui peut être soit calculé de manière théorique (Van Hook, 1968) soit déterminé expérimentalement (Baumgärtner et Kim, 1990) avec quelques approximations. Le VPIE correspond à la définition (9) et est considéré équivalent au facteur de séparation isotopique  $\alpha$  en négligeant les corrections liées au fait que le système soit composé de liquides et de gaz non-idéaux (Jancso et Van Hook, 1974 ; Kakiuchi, 2000) :

$$VPIE = \frac{P_{H_2O}}{P_{HTO}} \approx \alpha = \frac{(X_T / X_H)_L}{(X_T / X_H)_V} \quad (9)$$

avec

$P_{H_2O}$  et  $P_{HTO}$  : respectivement les pressions de vapeur de l'eau pure et de l'eau tritiée pure,

$\alpha$  : le facteur de séparation isotopique

$X_T$  et  $X_H$  : respectivement les fractions molaires de l'eau tritiée et de l'eau dans la phase liquide (L) et la phase vapeur (V).

On voit par cette relation que  $\alpha$  est dépendant de la température. Il faut cependant garder en tête que dans les différentes répétitions, la température reste constante, sauf mention du contraire.

L'expression (8) est modifiée afin de la rendre plus facilement comparable à nos résultats expérimentaux. Le volume et l'activité volumique résiduels ( $V_r$  et  $A_r$ ) sont remplacés par le volume et l'activité volumique extraits ( $V_e$  et  $A_e$ ) en utilisant les formules (10) et (11). On obtient ainsi l'expression (12) :

$$V_e = V_0 - V_r \quad (10)$$

$$V_{ext} A_{ext} = A_0 V_0 - A_r V_r \quad (11)$$

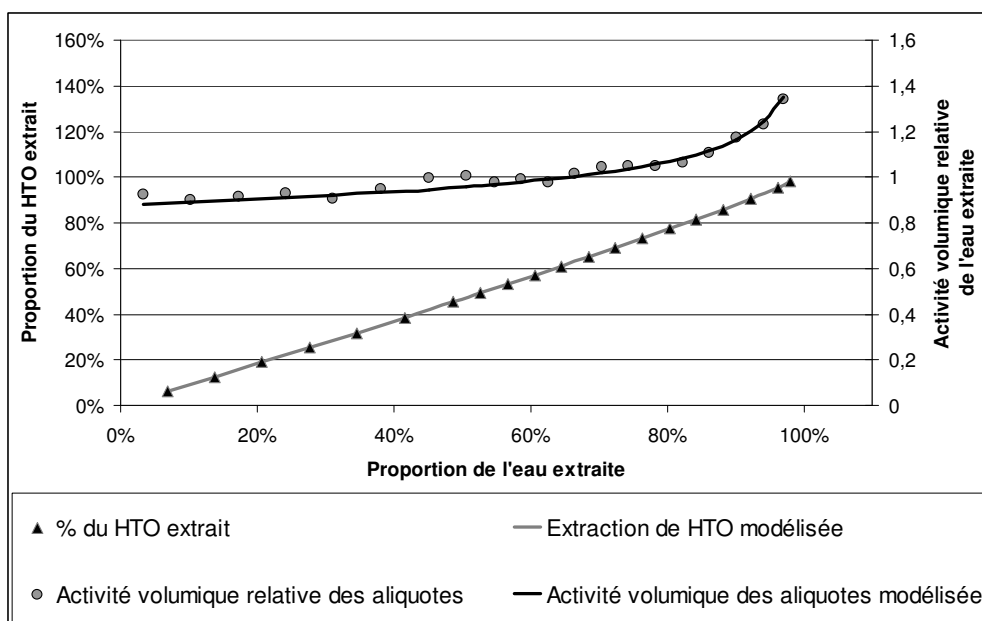
$$V_{ext} A_{ext} = A_0 V_0 \left( 1 - \left( \frac{V_0}{V_0 - V_{ext}} \right)^{\frac{-1}{\alpha}} \right) \quad (12)$$

Enfin, l'activité volumique de chaque aliquote ( $A_{(1-2)}$ ) est l'activité moyenne extraite entre  $V_1$  et  $V_2$ , qui sont respectivement les volumes d'eau extraits au début et à la fin du prélèvement de l'aliquote (13). A partir de la formule (11), on peut ainsi calculer  $A_{(1-2)}$  par la relation (14) :

$$(V_2 - V_1) \cdot A_{(1-2)} = A_2 V_2 - A_1 V_1 \quad (13)$$

$$(V_2 - V_1) \cdot A_{(1-2)} = A_0 V_0^{\frac{\alpha-1}{\alpha}} \left( (V_0 - V_1)^{\frac{1}{\alpha}} - (V_0 - V_2)^{\frac{1}{\alpha}} \right) \quad (14)$$

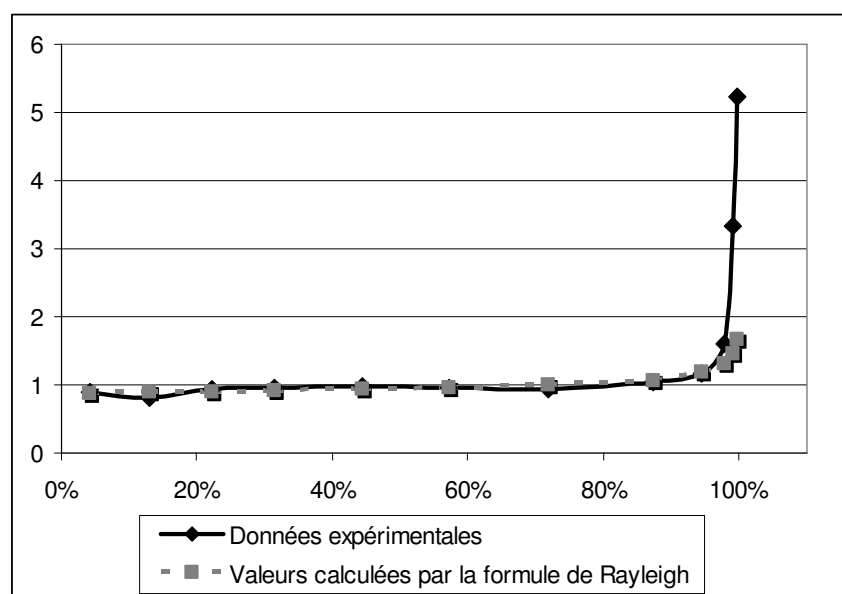
L'équation (14) correspond bien aux données obtenues lors de distillation d'un mélange HTO/H<sub>2</sub>O (**Figure 3-8**). A partir de ces données expérimentales,  $\alpha$  a été estimé à 1,14, ce qui est supérieur de 6,7 % à la valeur donnée par d'autres pour la température de notre distillation (Baumgärtner et Kim, 1990).



**Figure 3-8 : Extraction de HTO durant une distillation d'un mélange pur HTO/H<sub>2</sub>O en fonction du taux de déshydratation**

Les courbes sont calculées avec les équations (12) et (14). Les triangles et les cercles correspondent à des données expérimentales.

En revanche, l'activité volumique des aliquotes prélevées lors de distillations de lait ne sont pas correctement représentées par les formules (12) et (14), notamment lors de l'extraction des cinq derniers pourcents. Au cours de ces distillations, l'activité volumique augmente drastiquement au-delà de 85 % d'eau extraite (**Figure 3-9**).



**Figure 3-9: Evolution de l'activité volumique des aliquotes d'eau extraite au cours de l'extraction de l'eau libre**

Comparaison d'un jeu de données obtenues lors d'une distillation séquentielle avec les valeurs calculées par la formule de Rayleigh.

Alors que l'essentiel de l'eau est extraite (l'eau libre à proprement parler, représentant environ 97 % de l'eau extractible du lait), l'eau résiduelle de l'échantillon se comporte, au mieux, comme une solution non-idéale. Il nous est alors apparu nécessaire d'introduire dans (12) et (14) un terme correctif. Un tel terme correctif peut être obtenu de deux manières : soit d'une manière complètement théorique en décrivant toutes les sources de non-idéalité, soit en paramétrant une fonction afin qu'elle corresponde au mieux à l'effet observé. Dans l'optique d'une description théorique, dans sa forme la plus simple, un modèle peut prendre en compte deux fractions d'eau : l'eau de cosphère (ou d'hydratation) qui est dans le voisinage immédiat des particules en solution ou en suspension et l'eau libre qui conserve les propriétés du solvant pur (Jancso et Van Hook, 1974). Au cours de notre étude, l'objectif choisi a été de paramétrer une fonction erreur afin qu'elle rende compte correctement de nos données expérimentales et pouvoir ainsi prendre en compte et, par la suite, modéliser l'effet du fractionnement isotopique sur la métrologie de l'activité volumique de l'eau tritiée.

Pour rendre compte de l'augmentation observée à la fin de l'extraction de l'eau du lait, la relation (12) a été paramétrée en introduisant 2 paramètres sans dimensions  $p$  et  $\beta$  de la façon suivante (15):

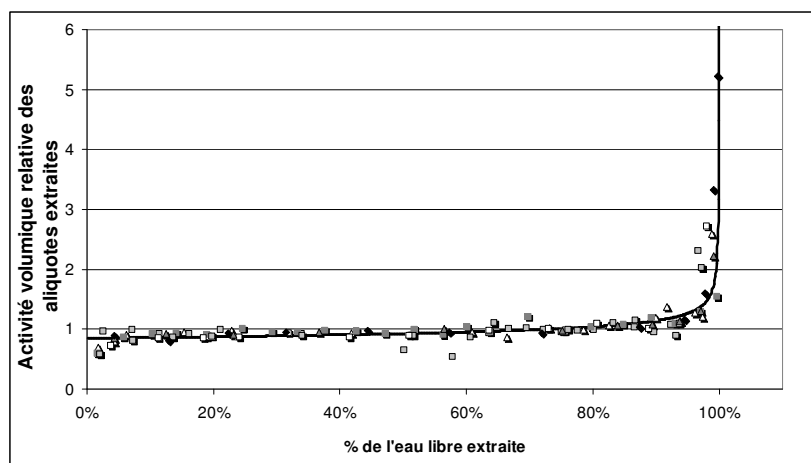
$$V_{ext} A_{ext} = A_0 V_0 \left( 1 - (1-p) \left( \frac{V_0}{V_0 - V_{ext}} \right)^{\frac{-1}{\alpha}} - p \left( \frac{V_0}{V_0 - V_{ext}} \right)^{\frac{-1}{\beta}} \right) \quad (15)$$

L'activité volumique d'une aliquote au cours d'une distillation séquencée est alors donnée par (16) :

$$(V_2 - V_1) A_{(1-2)} = A_0 V_0^{\frac{\alpha-1}{\alpha}} (1-p) \left( (V_0 - V_1)^{\frac{1}{\alpha}} - (V_0 - V_2)^{\frac{1}{\alpha}} \right) + A_0 V_0^{\frac{\beta-1}{\beta}} p \left( (V_0 - V_1)^{\frac{1}{\beta}} - (V_0 - V_2)^{\frac{1}{\beta}} \right) \quad (16)$$

Ces expériences ont été complétées par des distillations séquencées opérées sur différents laits. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 3-10** et **Figure 3-11**. Afin de pouvoir plus facilement comparer les résultats entre eux, les paramètres sont exprimés sous forme relative : pour le taux d'eau extrait, 100% correspond à la quantité d'eau extraite finale de chaque répétition. L'activité volumique est exprimée en fonction de la moyenne extraite à chaque répétition, à laquelle est attribuée la valeur 1.



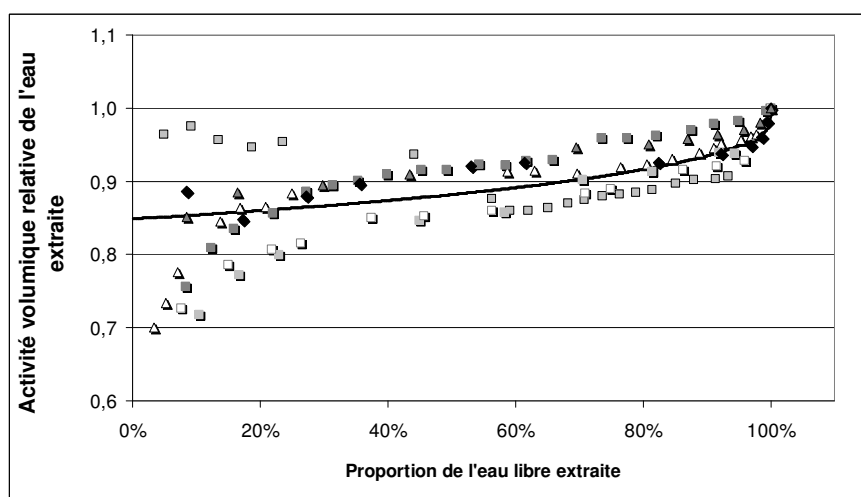


**Figure 3-10 : Evolution de l'activité volumique des aliquotes de l'eau extraite au cours de l'extraction d'eau**

La courbe est l'évolution modélisée de l'activité volumique des aliquotes au cours du taux d'extraction d'eau par (16) avec  $p = 0.0387$ ,  $\alpha = 1.14$ , and  $\beta = 11.7$ .

Chaque type de marque représente la série de données d'une répétition. Quatre répétitions ont été opérées sur un lait (carrés), deux sur un autre lait (triangles) et les losanges figurent une série opérée sur un troisième lait.

Dans la **Figure 3-10**, l'évolution de l'activité volumique de chaque aliquote prélevée semble suivre une fonction à deux composantes lorsqu'elle est représentée en fonction du taux d'extraction d'eau. On peut ainsi modéliser cette relation en utilisant l'expression (16). Les valeurs de  $p$ ,  $\alpha$ , et  $\beta$  permettant la meilleure correspondance entre le modèle et les résultats obtenus au cours des répétitions (qui sont respectivement 0,04, 1,14 et 11,7) ont été estimées par la fonction nlm du logiciel R (R Core Team, 2012) qui opère la minimisation d'une fonction donnée en utilisant un algorithme de type newtonien.



**Figure 3-11 : Evolution de l'activité volumique de l'eau extraite au cours de son extraction**

La courbe est l'évolution modélisée de l'activité volumique de l'eau libre au cours de l'extraction d'eau par (15) avec  $p = 0.0387$ ,  $\alpha = 1.14$ , and  $\beta = 11.7$ .

Chaque type de marque représente la série de données d'une répétition. Quatre répétitions ont été opérées sur un lait (carrés), deux sur un autre lait (triangles) et les losanges figurent une série opérée sur un troisième lait.

La première aliquote de chacune des répétitions présente une activité spécifique variable comparée à l'activité moyenne de la répétition. Il semble que cette variabilité soit un artefact lié aux conditions expérimentales. Il est remarquable sur la **Figure 3-11** que cette valeur peut avoir un impact sur l'activité moyenne extraite qui reste perceptible jusqu'aux 4-5 premières aliquotes.

Le modèle basé sur la relation (15) indique que même avec un (hypothétique) système de déshydratation parfait, si l'extraction d'eau est arrêtée alors qu'il reste 10 % d'eau (une situation qui peut se produire pour des matrices complexes, avec une température trop basse, une pression trop haute ou simplement un temps de séparation trop court), l'activité spécifique mesurée peut être sous-estimée d'environ 9 %.

## **2.4. Le volume mort : effets cumulés de plusieurs sources de biais**

En comparant les valeurs de l'activité volumique de l'eau extraite par chacune des deux techniques de distillation, il apparaît que les échantillons les plus légers (entre 15 g et 60 g) présentent des activités volumiques systématiquement inférieures après une distillation par évaporateur rotatif par rapport à l'eau extraite par distillation sous pression réduite avec le pont de distillation. Des expériences sont donc conduites pour trouver l'origine de ce phénomène.

Une des principales différences entre les deux techniques est la géométrie du réfrigérant des deux montages utilisés. Celle-ci conduit à un volume mort du réfrigérant de l'évaporateur rotatif d'environ  $7,0 \pm 1,2$  mL alors que celui du pont de distillation (un réfrigérant de Liebig) est seulement de  $0,69 \pm 0,25$  mL. Cela signifie que, lors d'une distillation par évaporateur rotatif, 7 mL d'eau doivent avoir rempli le volume mort avant que la première goutte de distillat ne puisse être recueillie et que, à la fin de la distillation, il reste 7 mL d'eau qui ne peuvent pas être récupérés sans risquer de perturber la mesure. Un modèle est établi pour représenter l'évolution de l'activité volumique extraite, celle moyenne de l'eau dans le réfrigérant et celle du distillat.

Prenons les postulats suivants :

- un effet de fractionnement isotopique est perceptible au cours de l'extraction de l'eau libre
- dans le réfrigérant de l'évaporateur rotatif, l'eau du volume mort et la vapeur d'eau extraite de l'échantillon se mettent instantanément à l'équilibre
- la masse d'eau dans le volume mort du réfrigérant est maintenue constante par l'écoulement vers le distillat de la même masse d'eau condensée que de vapeur provenant de l'échantillon et se condensant sur le réfrigérant.

Dans les expressions suivantes, l'indice « cond. » qualifiera l'activité volumique (ou la masse) de l'eau dans le réfrigérant à un instant donné, l'indice « ext. » sera quant à lui attaché à l'activité volumique (ou à la masse) de l'eau extraite de l'échantillon depuis le début de la distillation jusqu'à l'instant considéré.

A partir du début de la distillation et jusqu'à ce qu'un volume d'eau égal à celui du volume mort du réfrigérant soit extrait, nous avons l'expression suivante :

$$A_{cond.i} = A_{ext.i} \quad (17)$$

A partir du moment où le volume mort du réfrigérant est plein, l'équilibre est alors décrit par :

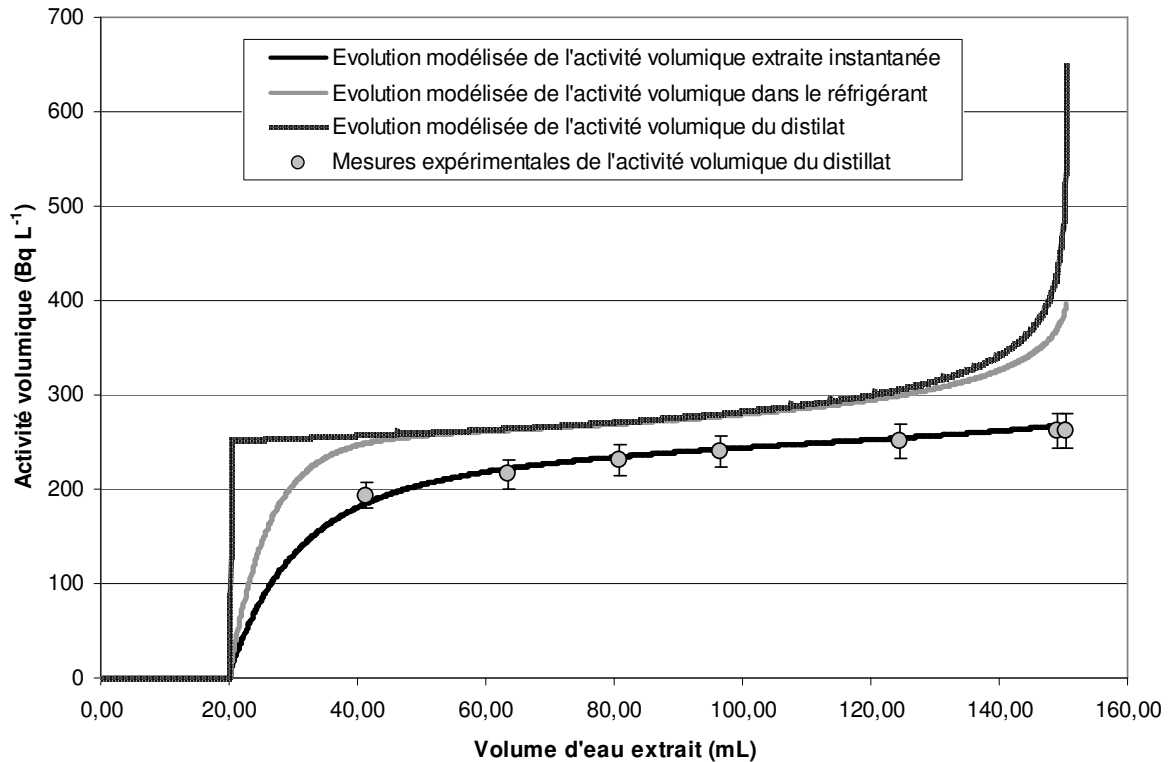
$$A_{cond.i} = \frac{V_{cond} \times A_{cond.i-1} + A_i \times (V_i - V_{(i-1)})}{V_{cond} + (V_i - V_{(i-1)})} \quad (18)$$

On considère que le distillat ne commence à couler du réfrigérant qu'à partir du moment où le volume mort de celui-ci est plein. L'indice « dist. » qualifie l'activité volumique (et la masse) de l'eau du distillat. On a alors :

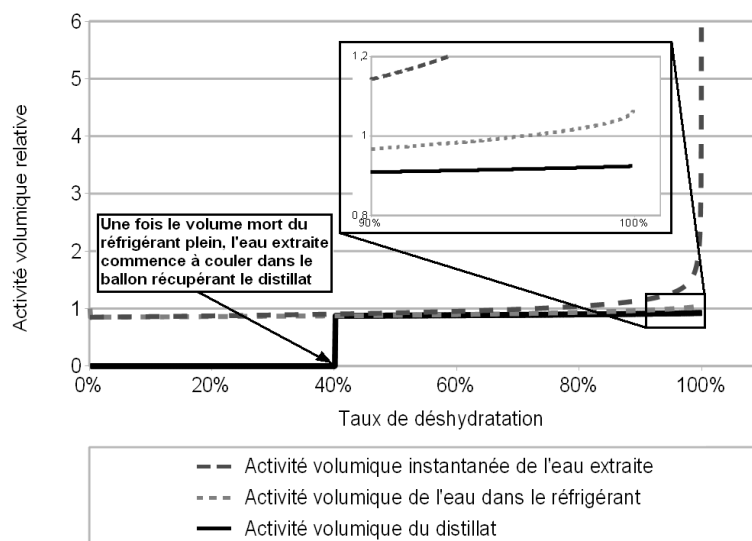
$$A_{dist.i} = \frac{V_{dist.i-1} \times A_{dist.i-1} + A_{cond.i} \times (V_i - V_{(i-1)})}{V_{dist.i}} \quad (19)$$

Ce modèle a été testé sur les données de nos différentes répétitions ainsi que sur une expérience spécifique : 30 mL d'eau de Vignolle (destinés à saturer le volume mort du

réfrigérant) puis de l'eau tritiée dont l'activité était connue ( $289 \pm 20 \text{ Bq L}^{-1}$ ) ont été distillés. Des aliquotes ont été prélevées au cours de la distillation de l'eau tritiée. L'écart moyen entre les valeurs prédites par le modèle et les données expérimentales est de  $1,07 \pm 2,44 \%$  (**Figure 3-12**). **Figure 3-12)**



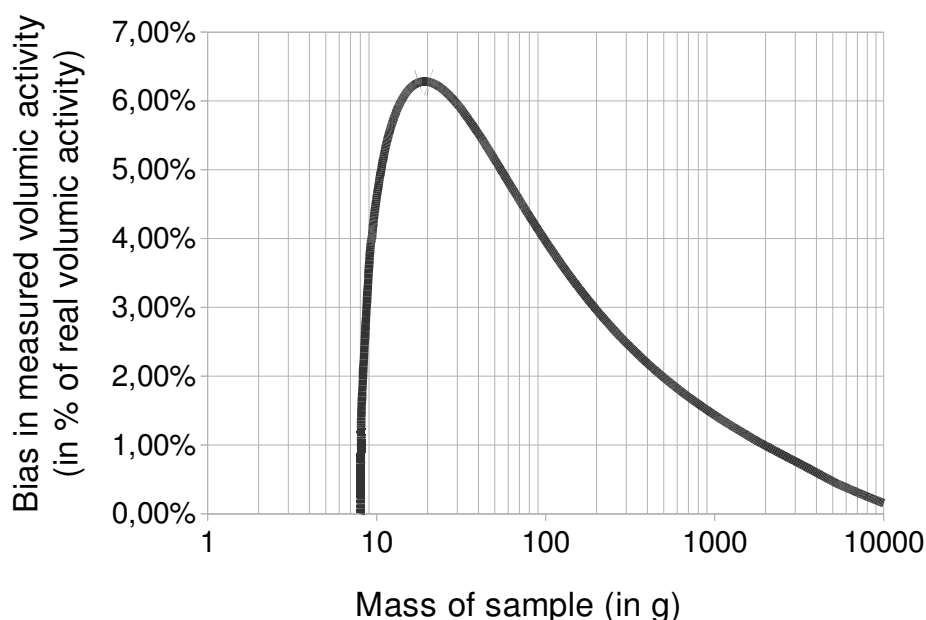
**Figure 3-12 : Modélisation de l'évolution de l'activité volumique extraite instantanée et des activités volumiques de l'eau dans le réfrigérant et le distillat d'un évaporateur rotatif**  
Les vingt premiers millilitres correspondent à la saturation préalable du volume mort du réfrigérant en eau non-tritiée. Les barres d'erreur représentent les incertitudes de mesures.



**Figure 3-13: Evolution modélisée de l'activité volumique de l'eau dans les différents compartiments de l'évaporateur rotatif durant la distillation d'un échantillon de 20 g de lait (activité volumique moyenne de l'eau extraite = 1).**

Ce modèle montre comment l'activité spécifique mesurée sur le distillat est influencée par l'eau piégée dans le volume mort (**Figure 3-13**). Il apparaît donc nécessaire de connaître, *a minima*, le volume mort de l'appareil employé pour l'extraction d'eau.

A partir du modèle proposé, il est possible d'évaluer comment évolue cette influence en fonction de la masse initiale d'eau dans l'échantillon et de son activité volumique (**Figure 3-14**). Dans le cas de l'évaporateur rotatif (avec un volume mort de 7 mL), le biais induit par le volume mort est inférieur à 5 % pour les échantillons de lait de moins de 15 g. Cela s'explique par le fait que l'intégralité de l'eau extraite remplit le volume mort et que les quelques gouttes qui s'en écoulent sont donc représentatives de l'eau dans le volume mort et donc de l'eau extraite. Pour les échantillons de lait compris entre 15 g et 75 g, la sous-estimation de l'activité volumique est proche de 6 %. Cela concorde avec les résultats présentés **Figure 3-7**. On voit en effet comment sont distribuées les activités volumiques mesurées sur des échantillons en fonction de leur taux final de déshydratation. Enfin, distiller des échantillons d'au moins 200 g est nécessaire pour que le biais induit par le volume mort soit inférieur à 3%.



**Figure 3-14 Evolution du biais du à l'évaporateur rotatif en fonction de la masse de l'échantillon traité.**

Le modèle décrit plus haut a tourné avec différentes masses d'échantillon (de 7 à 10 000 g) afin de déterminer comment le biais modélisé évolue dans cette fourchette de masse.

Par cette étude, nous avons montré que chacun des points méthodologiques que nous avons testés (influence de la méthode de déshydratation, de l'ambiance, de la masse de l'échantillon traité et du taux de déshydratation final) est susceptible d'induire un biais dans la mesure de l'activité volumique de l'eau extraite. Dans la plupart des situations de surveillance du tritium dans l'environnement, ces biais sont proches, quand ils ne sont pas inférieurs, à l'incertitude de mesure par scintillation liquide (de l'ordre de 15 % pour une mesure de 200 min d'un échantillon de 10 mL d'eau à 20 Bq L<sup>-1</sup>).

Il apparaît notamment que la **lyophilisation**, mise en œuvre tel que décrit plus haut, peut induire une pollution de l'eau extraite par l'eau atmosphérique. Dans le cas de Valduc, cela se traduit par une augmentation sensible de l'activité volumique de l'eau extraite. Lorsque cela est possible, il semble donc préférable de procéder à l'extraction d'eau par distillation sous vide.

Lorsqu'on s'est assuré que celle-ci n'est pas sensible aux conditions environnementales, un fractionnement isotopique peut cependant modifier également la valeur de la mesure si la distillation n'est pas conduite jusqu'à sec et/ou si le volume mort du système (notamment du réfrigérant) est trop important.

Pour les échantillons ne pouvant être distillés (la plupart des matrices solides), la **lyophilisation** doit alors être conduite avec beaucoup de précautions pour réduire au maximum les possibilités de pollution de l'eau extraite par l'eau atmosphérique (notamment en prenant garde à la condensation d'eau « parasite » dans le piège froid). L'augmentation de la taille des échantillons traités est en particulier une voie facile de limitation de l'influence de l'eau atmosphérique.

Nous montrons également dans cette étude un profil de fractionnement isotopique original par rapport à ce qui est décrit dans la littérature. Ce fractionnement isotopique (plus sensible que ceux habituellement décrits) est propre à une matrice régulièrement suivie et contrôlée dans les environs d'installations nucléaires : le lait. Parmi les origines possibles de ce comportement particulier, la différence entre l'eau dite « libre » et l'eau dite « liée » quant au fractionnement isotopique apparaît comme très probable. Les bons résultats obtenus avec le

modèle que nous avons mis en place confortent cette hypothèse. Des études complémentaires sont nécessaires pour la tester et préciser la nature des mécanismes physiques en jeu.

Au cours des 3 premières sections de la partie 3, nous avons testé la plupart des étapes de traitement des échantillons afin d'évaluer leur incidence sur la mesure dans les différents compartiments. Nous avons y également apporté des améliorations. Cependant, outre les techniques analytiques mises en œuvre, la représentation que nous avons du tritium dans les matrices biologiques est également susceptible d'induire des biais importants, notamment dans la mesure de la **discrimination isotopique**, comme montré ci-après.

### **3. Etude de la discrimination isotopique : éléments mathématiques et conceptuels**

L'**ubiquité** de l'hydrogène dans l'environnement et sa grande mobilité ont été évoquées à plusieurs reprises. Dans la multitude d'échanges et de transformations chimiques, le tritium circule-t-il en maintenant le même rapport isotopique T/H entre les différents compartiments<sup>4</sup> ou est-ce que certains transferts induisent un fractionnement isotopique (positif ou négatif) conduisant à des équilibres non-homogènes ? Cette question est de première importance en radioécologie et en radiotoxicologie puisque ces phénomènes de fractionnement isotopique conduiraient à l'appauvrissement de certains compartiments en tritium et à l'enrichissement d'autres.

Pour pouvoir y répondre, il est nécessaire soit de prendre en compte l'ensemble des flux d'hydrogène soit de s'assurer que certains flux sont nettement prépondérants entre lesdits compartiments.

---

<sup>4</sup> Compte tenu de la multiplicité des échelles possibles pour l'étude du tritium dans l'environnement (l'environnement global, l'écosystème, l'individu, l'organe, le tissu, la cellule, l'organite ou même la molécule), le terme compartiment est utilisé dans ce document de manière générique pour évoquer le transfert du tritium d'une unité (fonctionnelle ou spatiale) vers une autre.

Un autre frein à l'étude du fractionnement isotopique dans l'environnement est la capacité analytique du tritium : la seule différenciation des **TFWT**, **TOLe** et **TOLne** induit d'importantes simplifications, notamment dans la conceptualisation de la circulation du tritium dans un écosystème ou un être vivant. Nous allons tenter dans la section suivante de prendre en considération ces questions en vue de proposer des méthodes d'étude conduisant à une juste quantification du fractionnement isotopique, en tenant compte notamment des contraintes analytiques actuelles.

### 3.1. Fractionnement isotopique conduisant à l'eau libre des organismes

L'eau libre représente chez la plupart des végétaux terrestres environ 70 % de leur masse non-lignifiée (Hopkins, 1995).

Les expériences ont montré qu'il y avait peu ( $< 10^{-6}$  %) sinon aucune conversion de l'HT en HTO dans les plantes (Dunstall *et al.*, 1985). L'unique voie du tritium sous forme HT vers les plantes semble être son **oxydation** par les microorganismes présents dans les premiers cm du sol (Belot, 1986). Dans la plupart des situations, il est pertinent de considérer seulement l'HTO lorsqu'on étudie l'**exposition** d'un animal ou d'un végétal.

Comme cela a été décrit plus haut, l'eau libre des plantes intègre l'eau du sol et la vapeur d'eau atmosphérique avec des **cinétiques** et des contributions relatives variables. Pour pouvoir mettre en évidence une éventuelle **discrimination isotopique**, il est donc nécessaire de mesurer conjointement l'eau de ces trois compartiments.

Kim et Baumgärtner ont réalisé des expériences dans des conditions stables où le « sol » (une solution hydroponique) et la vapeur d'eau atmosphérique étaient en équilibre (Kim et Baumgärtner, 1994). Dans ces conditions, la **discrimination isotopique** liée à l'évaporation de l'eau a conduit à un appauvrissement de la vapeur d'eau atmosphérique d'environ 10 % par rapport à la solution hydroponique. Ils ont ainsi pu montrer que dans ces conditions l'orge et le maïs présentaient des activités volumiques de leur eau libre différentes : le **TFWT** de l'orge



était légèrement enrichi en tritium par rapport à la solution hydroponique (+ 2 %) alors que celui du maïs était appauvri (- 8,6 % par rapport à la solution hydroponique). Les auteurs concluent que cette différence est liée aux différences de métabolisme **photosynthétique** entre ces deux plantes (l'orge en C3, le maïs en C4) estimant que cela induit une différence dans la contribution relative de l'eau du sol et de l'eau atmosphérique dans leur eau libre ainsi que dans le taux de transpiration (qui génère également une **discrimination isotopique**).

La concentration en tritium dans l'eau libre n'est pas la même dans tous les organes d'une plante. Plusieurs auteurs (Amano *et al.*, 1995 ; Belot *et al.*, 1979 ; Raney et Vaadia, 1965) ont comparé l'activité volumique de l'eau libre dans différents organes de végétaux. Ils ont trouvé que l'activité volumique de l'eau libre de certains organes (notamment dans la tige, les pétioles ou les fruits) pouvait être égale à celle de l'eau du sol mais pas dans les feuilles où la contribution de l'eau du sol dépasse rarement 60 %, le reste provenant de l'atmosphère. Un modèle simple a été déduit de ces expériences puis optimisé (IAEA, 2009) (20) :

$$C_{TFWT} = [RH.C_{atm} + (1 - RH).C_{sol}] / \gamma \quad (20)$$

avec

$C_{TFWT}$  : le **TFWT** dans les feuilles,

$C_{sol}$  : la concentration en HTO de l'eau du sol,

$C_{atm}$  : la concentration en HTO de la vapeur d'eau atmosphérique,

RH : l'humidité relative de l'atmosphère

$\gamma$  (=0.909) est le ratio entre la pression de vapeur de l'HTO et celle de l'H<sub>2</sub>O sous les conditions thermodynamiques environnementales (P ~ 1013 mbar et T ~ 20 °C).

Cette relation ne fonctionne pas avec toutes les espèces de plantes. Belot estime que cela est dû au fait qu'une partie de l'eau dans les vaisseaux n'est pas accessible aux échanges isotopiques (Belot, 1986). Quoiqu'il en soit, on considère dans cette expression qu'il n'y a pas d'autres effets isotopiques que celui lié aux différences de pressions de vapeur au cours de l'incorporation par la plante de l'eau du sol et de la vapeur d'eau atmosphérique.

Dans d'autres expériences en conditions contrôlées, Strack et al. ont montré que plus les feuilles sont éclairées (avec une densité de flux photonique compris entre 0 et  $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), plus la contribution relative de l'eau atmosphérique au **TFWT** est importante (Strack *et al.*, 1995). Comme la relation entre le taux de **photosynthèse** et la température et/ou l'éclairement n'est pas linéaire, cela peut être généralisé en considérant que plus le taux de **photosynthèse** est important dans les feuilles (en fonction de la température, de l'éclairement et du stade de croissance de la plante), plus l'eau atmosphérique contribue au **TFWT** de la plante.

En conditions environnementales, l'eau atmosphérique est généralement échantillonnée en continu par **barbotage** sur plusieurs jours alors même que le **TFWT** intègre l'activité tritium du sol et de l'atmosphère durant les quelques heures qui précèdent le prélèvement. Cela permet de comprendre pourquoi, dans ces conditions, les données permettent rarement de décrire les mécanismes en jeu dans la plante et les équilibres entre le **TFWT**, l'eau du sol et l'eau atmosphérique (Boyer *et al.*, 2009b). La dynamique de l'eau du sol est relativement lente comparée à celle de l'atmosphère (Guétat, 2013), c'est donc une source plus stable d'eau tritiée à l'échelle de la semaine. Elle intègre les dépôts secs de la vapeur atmosphérique ainsi que les précipitations sur plusieurs semaines. Concernant les transferts air-feuilles, d'importantes fluctuations existent à l'échelle de la journée voire moins. Celles-ci sont liées à l'instabilité des vents (vitesse et direction) et aux échanges rapides entre l'eau libre des plantes et l'air. Ainsi, les fluctuations du **TFWT** dans les plantes suivent les variations de l'HTO atmosphérique modérées par l'apport de l'eau du sol (Guétat *et al.*, 2013).

Les animaux sont également composés d'une large part d'eau. L'eau représente par exemple près de 60 % de la masse corporelle des mammifères (Richmond *et al.*, 1962). La principale source d'eau pour les animaux terrestres est leur eau de boisson. Chez l'Homme, l'eau de boisson représente près de 50 % de ses apports journaliers. Le reste est composé par l'eau des aliments (35 %) et par l'eau formée par le métabolisme (15 %). Les absorptions cutanée et pulmonaire sont négligeables devant les autres sources (ANC, 2001). La multiplicité des sources d'eau rend difficile l'estimation d'un éventuel fractionnement isotopique entre les apports d'eau et l'eau libre de l'animal dans les conditions environnementales. Les expériences ont plutôt mis en évidence qu'il n'y avait pas d'effet isotopique après l'absorption

d'eau tritiée, qu'elle soit par ingestion, injection intraveineuse ou inhalation (Balonov *et al.*, 1974 ; Pinson et Anderson, 1950).

Le tritium sous forme de **TFWT** semble plutôt bien distribué entre les fluides et les organes après l'absorption d'HTO (Trivedi *et al.*, 1995) ou de **glucose** tritié (Arai *et al.*, 1985). Ce dernier résultat est certainement partagé par tous les composés qui entrent spécifiquement dans le métabolisme énergétique. L'équilibre isotopique entre les fluides corporels est atteint chez l'Homme 45 minutes après l'absorption d'eau tritiée (Pinson et Anderson, 1950).

## 3.2. Fractionnement isotopique de l'hydrogène, de l'eau libre au TOL

Le **TOLt** inclue le **TOLe** et le **TOLne**. Il est habituel d'estimer la fraction de **TOLe** à 22 % du **TOLt** (IAEA, 2009). Cependant, la contribution relative du **TOLe** dans une matrice dépend de la fraction d'hydrogène échangeable qui est fonction de la composition chimique de la matrice considérée. Le **Tableau 3-3** donne quelques exemples de molécules organiques. A la lumière de ces quelques chiffres, la valeur de 22 % sous-estime la fraction labile de l'hydrogène dans la plupart des cas.

**Tableau 3-3 : Fraction échangeable de l'hydrogène de molécules organiques majeures estimées à partir de calculs stœchiométriques**

	Teneur moyenne en hydrogène (% du poids sec)	Teneur en hydrogène calculée <sup>1</sup> (% du poids sec)	Teneur en hydrogène non-échangeable (% du poids sec)
Saccharose C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	6,1	6,41	64 (55 <sup>1</sup> )
Cellulose (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub>	6,2	6,21	70
Amidon (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub>	6,8	6,21	72
Protéines	6,8	7,52	75 (73 <sup>2</sup> )
Lipides	12,0		95-100

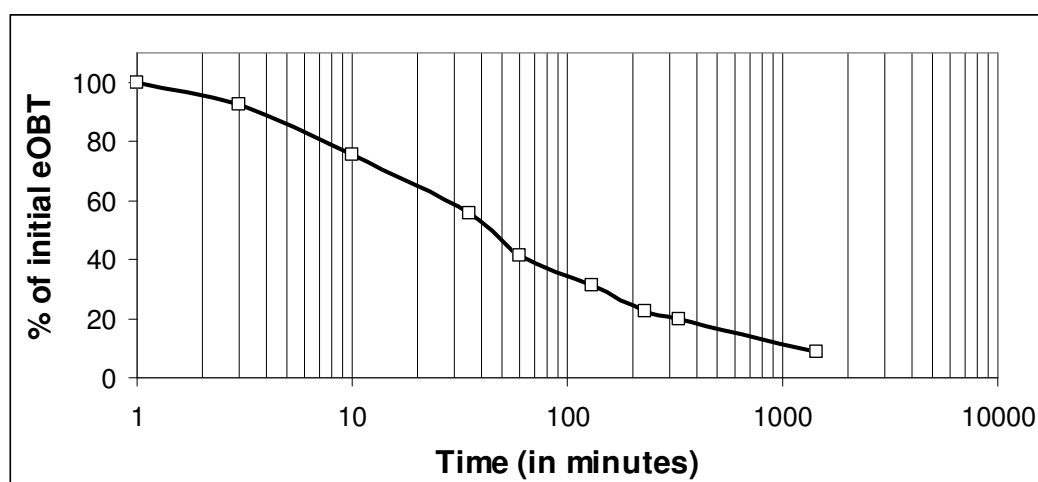
<sup>1</sup> : calculées à partir des formules brutes

<sup>2</sup> : estimée pour une protéine moyenne de mammifère

Les autres valeurs sont extraites de (Diabaté et Strack, 1993).

La contribution relative du **TOLe** au **TOLt** varie également en fonction des conditions d'**exposition** au tritium (Kim et Korolevych, 2013) et du temps entre l'**exposition**, le prélèvement et la mesure (surtout si pas assez de soins sont portés pour éviter le démarquage (ou le marquage) par l'ambiance à partir du prélèvement).

Le **TOLe** est considéré comme se mettant rapidement en équilibre avec l'eau libre (Belot, 1986) mais une fraction non-évaluable de cet hydrogène labile s'échange très lentement du fait de son inaccessibilité à l'eau libre (Diabaté et Strack, 1993). Kim et Baumgartner ont procédé à des expériences durant lesquelles ils laissaient à l'air libre des échantillons de maïs tritié séché et pulvérisé et mesuraient l'évolution de l'activité du **TOLt**. Les résultats sont présentés dans la **Figure 3-15** (Kim et Baumgärtner, 1991).



**Figure 3-15 : Vitesse d'échange du TOLe de plants de maïs séchés et réduits en poudre dans un air ambiant à 30,1 % d'humidité relative**  
Le taux de TOLe est estimé à partir de la valeur de TOLne obtenue après un rinçage isotopique. La figure est basée sur des données tabulées dans (Kim et Baumgärtner, 1991).

Dans cette expérience, 8 % du TOLe est toujours dans la matière sèche du maïs après un jour d'**exposition** à l'atmosphère ambiante. Ces résultats ne peuvent pas être comparés avec des conditions environnementales : d'un côté, le métabolisme des plantes et des animaux fait « respirer » les macromolécules, augmentant ainsi l'accessibilité des **hydrogènes** « enfouis ». D'un autre côté, comme le maïs est séché et pulvérisé, l'hydrogène caché est rendu plus accessible, du fait notamment de l'augmentation de sa surface spécifique.

Des auteurs (comme dans Belot, 1986 ; Brudenell *et al.*, 1997 ; Koranda et Martin, 1972) ont mesuré l'évolution du **TFWT** dans les plantes exposées à l'air ambiant après une **exposition** à de l'HTO. La diminution de l'activité volumique suit une décroissance exponentielle à 2 voire

à 3 composantes. La première (qui représente environ 99 % du **TFWT**) a une **demi-vie** biologique de 30 à 60 minutes, ce qui concorde avec l'estimation habituelle de la **demi-vie** du **TFWT**. La deuxième composante (environ 1 % du **TFWT**) a une **demi-vie** biologique de 15-30 heures. Les auteurs expliquent cette deuxième composante comme étant la perte de tritium moins accessible dans les plantes (dans la tige ou le système racinaire). Comme ce deuxième compartiment est très petit comparé au premier, il semble également possible qu'il corresponde à l'**hydrogène enfoui**, rendu accessible au rythme de la « respiration » des biomolécules. Cette hypothèse concorde avec l'estimation de la **demi-vie** du **TOLe** par Heling et Galeriu (environ 12-24 heures) (Heling et Galeriu, 2002). Belot explique le troisième compartiment par la décontamination des racines et de la tige qui ont été marquées par translocation du phloème. La période de ce troisième compartiment étant similaire à celui du **TOLne** (Belot, 1986 ; Koranda et Martin, 1972), il semble également possible que ce troisième compartiment soit lié à l'**anabolisme** de certaines molécules tritiées.

Ces quelques résultats sur la **demi-vie** biologique du **TOLe** permettent de comprendre les difficultés pour estimer la fraction que représente l'**hydrogène enfoui** et sa **demi-vie** biologique. Cela rend impossible la déduction du **TOLne** à partir du **TOLt** (comme mentionné par d'autres auteurs (Pointurier *et al.* 2004; Baglan *et al.* 2011; Kim *et al.* 2011) même si cela est estimé à partir de l'activité du **TFWT**. Il n'est pas non plus possible d'avoir des données reproductibles sur le fractionnement isotopique entre le **TFWT** et le **TOLt**. Les expériences ont montré que le ratio **TOLne/TOLe** peut varier du tout au tout selon les conditions d'**exposition** (Hill et Johnson, 1993).

### 3.3. Le fractionnement isotopique de l'hydrogène entre l'eau libre et le **TOLne**

#### 3.3.1. Le **TOLne** mesuré n'est pas (que) du **TOLne**

Comme décrit plus haut, le **TOLne** est mesuré après un **rinçage isotopique** de l'échantillon sec avec de l'eau non-tritiée selon deux techniques (voir Partie 1.1.3). Certains biais dans la quantification du **TOLne** peuvent être induits par l'échange isotopique. D'abord, quand des échantillons biologiques sont pulvérisés et mélangés avec de l'eau pendant 24 h à 78 h,

différentes évolutions peuvent se dérouler : des actions enzymatiques, le développement de microorganismes, la fermentation de la matière organique, etc. Ces évolutions peuvent induire des variations (augmentation ou diminution) des quantités de **TOLne** et d'HTO.

Ensuite, certains composés organiques (sucres, **acides aminés**, etc.) se dissolvent durant l'échange. Si l'eau et la matière sèche sont d'abord séparées par filtration, la fraction soluble de l'échantillon sec passera avec le filtrat et ne sera donc pas quantifiée comme du **TOLne**. Cela peut modifier le rapport Tritium/Hydrogène dans la mesure du **TOLne** (Bacchetta *et al.*, 2012).

Enfin, la question cruciale est la fiabilité de l'échange isotopique tel qu'il est généralement pratiqué préalablement à la mesure du **TOLne**. Certains auteurs, en particulier dans (Baumgärtner et Donhaerl, 2004 ; Baumgärtner *et al.*, 2009), montrent qu'une fraction significative du **TOLe** peut rester dans la matière sèche, même après deux échanges isotopiques avec de l'eau non-tritiée. Ils considèrent qu'une fraction de l'hydrogène labile (hydrogène sous forme d'eau ou fixé aux **hétéroatomes** (oxygène, soufre ou azote) des biomolécules) n'est pas accessible à l'échange isotopique du fait de l'encombrement stérique ou de la conformation moléculaire. Cela concorde avec des observations faites sur la cellulose (voir par exemple Yamada *et al.*, 1992). Baumgärtner et ses coauteurs considèrent également que cette fraction peut être enrichie en tritium du fait de transferts cumulatifs de l'eau vers les liaisons hydrogènes des biomolécules. Ils qualifient cette fraction de « *buried tritium* » (que nous traduirons ici par « **tritium enfouis** »). D'autres auteurs ont cherché à estimer l'incidence de ce « **tritium enfoui** » sur la mesure du **TOLne** (Kim *et al.*, 2008). Ils ont conclu au fait que cela pourrait conduire au maximum à une surestimation du **TOLne** entre 5 % (dans les plantes) et 20 % (dans les poissons).

### 3.3.2. La concentration du tritium dans l'eau de combustion de la matière sèche rincée n'est pas celle du **TOLne**

Le **TOLne** est certainement le principal sujet actuel de controverse en radioécologie du tritium, en radiotoxicologie et en radioprotection. Parmi les questions qui se posent, il y a

celles autour du fractionnement isotopique au cours du métabolisme à l'échelle d'un organisme ou d'un écosystème et la possibilité qu'il puisse conduire à une amplification de la fraction du **TOLne** au cours des voies métaboliques successives. Il est habituel de comparer l'activité volumique de l'HTO, dans l'environnement ou dans l'organisme, à l'activité volumique de l'eau de combustion de l'échantillon sec après avoir procédé à un **rinçage isotopique**. On peut ainsi comparer des rapports T/H entre compartiments sans avoir à prendre en compte leur nature chimique.

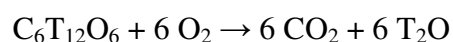
Dans la littérature, ce ratio d'activité volumique est appelé RSA (pour Relative Specific Activity), **SAR** ou simplement R. Ce ratio paraît être un bon moyen pour évaluer la **discrimination isotopique** entre compartiments. Cependant, une correction doit y être apportée pour interpréter ce ratio.

Même si on considère généralement que l'eau de combustion ne contient que le **TOLne**, l'hydrogène qui constitue l'essentiel de cette eau provient à la fois de l'hydrogène non-échangeable et échangeable (Gontier et Siclet, 2011 ; Jean-Baptiste *et al.*, 2007 ; Jean-Baptiste *et al.*, 2010). En effet, procéder à un **rinçage isotopique** de la matière sèche induit de fait une dilution isotopique du **TOLne**. Considérons par exemple une molécule de **glucose** intégralement tritiée ( $C_6H_{12}O_6$ ) comme représentée dans la **Figure 3-16(a)**.

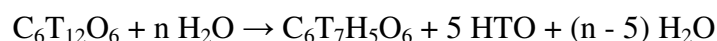


**Figure 3-16 :** (a) Tous les hydrogènes de la molécule sont remplacés par du tritium (b) Les tritium en position labile (les tritium échangeables) ont été remplacés par du protium.

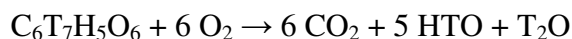
Pour mesurer le **TOLt**, on procède à la combustion, selon la réaction :



Afin de mesurer le **TOLne**, la molécule doit d'abord être rincée avec de l'eau non-tritiée en excès (21) :



Ensuite, la molécule produite par (21) est complètement oxydée selon :



L'eau de combustion du **TOLne** est 7/12 moins concentrée en tritium que l'eau de combustion du **TOLt** alors que la fraction non-échangeable de l'hydrogène est toujours 100 % tritiée. Si on compare cette activité volumique à l'activité volumique du T<sub>2</sub>O pur, le RSA serait de 7/12, ce qui ne rend pas parfaitement compte de la fraction non-échangeable de l'hydrogène qui est occupée par du tritium (à savoir 100%). La correction à appliquer pour que le RSA décrive le fractionnement isotopique entre T<sub>2</sub> et le **TOLne** est de le diviser par la fraction d'hydrogène qui est non-échangeable dans la matrice étudiée. L'activité volumique de l'eau de combustion reflétant, à une constante près, le rapport T/H de la matière sèche d'une matrice, en appliquant la correction proposée sur l'eau de combustion de matière sèche après **échange labile**, on obtient alors, à un facteur près, le rapport T<sub>ne</sub>/H<sub>ne</sub>. On peut alors comparer cette valeur entre différentes matrices, indépendamment de leur nature initiale.

On peut appliquer cette correction aux résultats de Weinberger et Porter (1953). Dans leurs expériences, les auteurs ont estimé que l'activité tritium était seulement 47 % de celle attendue sans **discrimination isotopique**. Si on corrige leurs résultats par la fraction non-échangeable de l'hydrogène dans les *Chlorella pyrenoidosa* (estimée à 79 % dans Spoehr et Milner, 1949), les résultats montrent qu'on est en fait à 62 % de l'activité théorique sans **discrimination isotopique**.

Le **Tableau 3-4** synthétise des résultats extraits de la littérature avec et sans la correction proposée. Ne sont présentés dans ce tableau que des résultats pour lesquels les auteurs ont donné suffisamment de précision sur leur mode opératoire pour être sûr qu'ils comparent bien du **TOLne** à du HTO. La fraction non-échangeable de l'hydrogène (le facteur de correction) a été estimée en utilisant différentes références permettant de calculer la contribution relative des protéines, des sucres, des lipides et des fibres à la matière sèche. Ensuite, la moyenne pondérée de la fraction non-échangeable de l'hydrogène a été calculée à partir des données présentées dans le **Tableau 3-3**.



**Tableau 3-4 : Des exemples de ratios TOLne/HTO avec une correction proposée afin d'évaluer le fractionnement isotopique**

Fractionnement isotopique						
Nature de la matière sèche analysée	Eau prise comme référence	Nom donné au ration tel que mentionné dans la référence	Ratio estimé dans la référence	Facteur de correction *	Ratio corrigé	Références
Végétaux						
Données environnementales						
Feuilles d'arbre	HTO in rain		1,6	0,70	2,29	(Pointurier <i>et al.</i> , 2004)
			3	0,70	4,29	
Plantes	HTO atm	plant OBT/air HTO ratios	0,12-0,56	0,78 <sup>1</sup>	0,15-0,72	(Davis <i>et al.</i> , 2005)
Végétation	TFWT	OBT/TFWT ratio	0,6-1,0	0,78 <sup>1</sup>	0,77-1,28	(Kotzer et Workman, 1999)
<i>Fucus serratus</i>	TFWT	rapports OBT/HTO	1,3	0,66	1,97	(Lebaron-Jacobs et Renaud, 2009)
			1,3		1,97	
			1,1		1,67	
			0,8	0,66	1,21	
<i>Fucus vesiculosus</i>	TFWT	rapports OBT/HTO	1	0,66	1,52	
			1,2	0,66	1,82	
Feuilles d'arbre	TFWT	R	0,04-1,0	0,70	0,06-1,43	(Baglan <i>et al.</i> , 2011)
Fruits et tubercules	HTO atm	RF (Reduction factor)	0,93	0,66 à 0,75	1,24 à 1,41	(Korolevych et Kim, 2013)
Exposition chronique en conditions contrôlées						
Feuilles et tiges de luzerne	TFWT	OBT-to-HTO ratios	0,78	0,72	1,08	(Diabaté et Strack, 1993)
Orge	TFWT	OBT-to-HTO ratios	0,73	0,73	1	
Maïs	TFWT	OBT-to-HTO ratios	0,64	0,73	0,88	
Orge	TFWT	Rstable	0,55	0,75	0,73	(Kim et Baumgärtner, 1994)
Maïs	TFWT	Rstable	0,60	0,73	0,82	
Feuilles de komatsuna	TFWT	OBT/HTO ratio in plants	0,06-0,24	0,68	0,09-0,35	(Amano <i>et al.</i> , 1995)
Feuilles de radis	TFWT	OBT/HTO ratio in plants	~0,5	0,70 <sup>2</sup>	~0,71	
Radis	TFWT	OBT/HTO ratio in plants	~0,125	0,67	~0,19	
Feuilles de tomate	TFWT	OBT/HTO ratio in plants	~0,35	0,70	~0,50	
Folioles de tomate	TFWT	OBT/HTO ratio in plants	~0,22	0,70 <sup>3</sup>	0,31	
Exposition aiguë ou de courte durée en conditions contrôlées						
Feuilles de blé	TFWT après exposition (conditions nocturnes)	relative OBT concentration	0,4% - 0,8%	0,70	0,57% - 1,14%	(Diabaté et Strack, 1997)
Feuilles de blé	TFWT après exposition (conditions diurnes)		1,0% - 1,8%	0,70	1,43% - 2,57%	
Plant de riz	HTO atm	relative OBT concentration	0,7% - 1,2%	0,71 <sup>4</sup>	1,0% - 1,7%	(Choi <i>et al.</i> , 2002)
Feuilles de riz	TWT dans l'eau des feuilles à la fin de l'exposition	TLI	0,1% - 0,2%	0,70	0,1% - 0,3%	(Galeriu <i>et al.</i> , 2013)
Grains de riz			0,10% - 0,14%	0,71	0,14% - 0,20%	

Animaux						
Données environnementales						
TOL des urines (exp. aiguë)	HTO in urine		0,001 (2,5 jours après exposition)	0,45 <sup>5</sup>	0,0022	(Trivedi <i>et al.</i> , 1995)
TOL des urines (exp. aiguë)	HTO in urine		0,09 (100 jours après exposition)	0,45 <sup>5</sup>	0,2	
Bulot	TFWT	rapports OBT/HTO	1,9	0,73	2,6	(Lebaron-Jacobs et Renaud, 2009)
Patelle			1,1	0,77 <sup>6</sup>	1,43	
			0,8	0,77	1,03	
			0,8	0,77	1,03	
Homard			0,8	0,76	1,05	
			0,9	0,76	1,18	
Carrelet			1,5	0,76	1,97	
Sole			1,0	0,78	1,28	
Labre			1,4	0,79	1,77	
			1,0	0,79 <sup>7</sup>	1,30	
Animal	HTO atm	OBT/air HTO ratios	0,18-0,45	0,78 <sup>1</sup>	0,23-0,58	(Davis <i>et al.</i> , 2005)
Mammifères terrestres	HTO in media water	SAR	0,25	0,69 <sup>8</sup>	0,36	(Galeriu <i>et al.</i> , 2005a)
Exposition chronique en conditions contrôlées						
ADN dans différents organes	TFWT	Relative specific activity	0,76 (de 0,66 à 1,07)	0,83	0,92 (from 0,80 to 1,29)	(Commerford <i>et al.</i> , 1977)
Zooplancton	HTO in media water	SAR	0,4	0,78 <sup>1</sup>	0,51	(Galeriu <i>et al.</i> , 2005a)
Mollusques	HTO in media water		0,3	0,77	0,39	
Crustacés	HTO in media water		0,25	0,75	0,33	
Poisson	HTO in media water		0,25	0,79 <sup>7</sup>	0,32	
Truite arc-en-ciel	TFWT		0,19	0,80	0,24	(Kim <i>et al.</i> , 2013)

\* : lorsque c'est possible, le facteur de correction est calculé par la formule (21) :

$$0,75 \cdot A + 0,95 \cdot B + 0,64 \cdot C + 0,70 \cdot D \quad (21)$$

avec A, B, C et D qui sont respectivement les fractions relatives (en %) des protéines, lipides, sucres et fibres de la matière sèche des matrices étudiées (Agricultural Research Service. US Department of Agriculture, 2012 ; Spector, 1956). Les coefficients (0,75, 0,95, 0,64 et 0,70) sont déduits du **Tableau 3-3**,

<sup>1</sup> : valeur non trouvée. La valeur de 0,22 est retenue pour approximer la correction.

<sup>2</sup> : valeur non trouvée. Le ratio utilisé est la moyenne des valeurs pour les feuilles de différentes espèces (écart-type = 0,017)

<sup>3</sup> : valeur non trouvée. Le ratio a été estimé comme étant égal à celui des feuilles de tomates.

<sup>4</sup> : ratio estimé à partir des poids relatifs des différents organes dans un plant de riz (Choi *et al.*, 2002) et de la valeur moyenne pour la paille de différentes espèces de graminées.

<sup>5</sup> : valeur calculée à partir de Putnam (1971)

<sup>6</sup> : ratio moyen pour différents autres mollusques

<sup>7</sup> : ratio moyen pour différents autres poissons

<sup>8</sup> : ratio calculée à partir des valeurs trouvées pour le lapin

Dans le **Tableau 3-4**, la valeur moyenne du facteur de correction est de  $0,71 \pm 0,07$  ( $k=2$ ) pour les plantes et  $0,74 \pm 0,20$  pour les animaux ( $0,77 \pm 0,06$  si les valeurs des urines ne sont pas prises en compte). Dans les données environnementales, le **RAS** moyen des plantes est  $1,16 \pm 1,34$  et  $1,69 \pm 1,96$  respectivement sans et avec correction. Pour les animaux, les valeurs moyennes sont  $0,85 \pm 0,93$  et  $1,12 \pm 0,73$ . Pour les **expositions** chroniques dans des conditions contrôlées, les valeurs moyennes des **RAS** des plantes sans et avec correction sont  $0,46 \pm 0,48$  et  $0,64 \pm 0,64$  et elles sont  $0,36 \pm 0,18$  et  $0,45 \pm 0,27$  pour les animaux. On remarque que le **RAS** mesuré dans les organismes exposés chroniquement dans des conditions contrôlées est systématiquement plus bas que les **RAS** environnementaux comme cela a été mentionné par Jean-Baptiste *et al.* (2009). Le **RAS** des animaux est également plus bas que celui des plantes.

Dans leur article, Jean-Baptiste *et al.* (2009) montrent comment des variations saisonnières de la teneur de l'atmosphère en HTO explique partiellement la différence dans les ratios **TOLne**/HTO selon qu'ils soient mesurés sur des organismes exposés chroniquement dans des conditions contrôlées ou prélevés dans l'environnement. Leur explication tient dans le fait que le **TFWT** des plantes se met rapidement en équilibre avec l'HTO atmosphérique alors que, comme cela a été également précisé plus haut, le **TOLne** intègre le tritium durant la synthèse de sa matière organique. Deux types de variations de la teneur en HTO de l'atmosphère sont décrite dans leur article : une variation saisonnière (le maximum est atteint en mai, le minimum en novembre) et un bruit aléatoire. En jouant uniquement sur ces deux paramètres et en considérant qu'il n'y a pas de fractionnement isotopique, les auteurs ont simulés des ratios **TOLne**/HTO qui sont compris entre 0,8 et 4,0 (moyenne : 1,45). Cela illustre comment l'utilisation du facteur de correction dans des conditions environnementales est encore susceptible d'entraîner un biais significatif dans l'évaluation du fractionnement isotopique.

### 3.3.3. L'incorporation dynamique du tritium de l'HTO au TOLne n'est pas un fractionnement isotopique

Une autre façon d'exprimer la formation de **TOL** dans un animal ou un végétal exposé à du tritium est de calculer le taux de transfert (ou le taux de production de **TOL** (Amano *et al.*,

1995), le taux de formation de **TOL** (ou taux de perte) (Kim *et al.*, 2013) ou le taux de conversion (Boyer *et al.*, 2009b) selon la formule (22) (Atarashi-Andoh *et al.*, 2002).

$$\frac{dC_{OBT}}{dt} = v \times C_{HTO} \quad (22)$$

avec :

$C_{OBT}$  (en Bq L<sup>-1</sup> d'eau de combustion ou équivalent eau) : la concentration en **TOL** de l'organisme ou d'une de ses parties,

$v$  (h<sup>-1</sup>) : le taux de conversion du HTO (**TFWT**, HTO de la vapeur d'eau atmosphériques ou HTO dans l'eau du sol) en **TOL**

$C_{HTO}$  (en Bq L<sup>-1</sup>) : l'activité volumique du **TFWT**, de la vapeur d'eau atmosphérique ou de l'eau du sol.

Dans les situations où l'organisme (ou sa partie étudiée) est de masse constante durant l'**exposition**, ce taux donne une bonne indication sur le taux de renouvellement de la matière organique globale ou d'une classe particulière de molécules.

Par exemple, d'après les données présentées dans Choi *et al.* (2002), il est possible d'évaluer  $v$  à différentes étapes pour la paille (feuilles et tige) ou pour la plante entière. On peut observer que durant la première journée après l'**exposition**,  $v$  pour la plante entière est significativement plus bas que pour la paille. Cela peut s'expliquer par le fait que la paille (et les feuilles en particulier) perdent du **TOLne** par conversion ou translocation alors que  $v$  pour la plante entière ne représente que la perte nette de **TOLne** pour la plante.

Cette comparaison est pertinente car la masse de paille ou de la plante est considérée constante durant la période de suivi. Dans Choi *et al.* (2002), le défaut de  $v$  semble particulièrement évident pour la plante entière entre 240 h et 1000 h après l'**exposition** puisque  $v$  durant cette période est de -0,38 % h<sup>-1</sup> (plus bas que pour la paille) alors que l'activité par plant est constante. La valeur négative observée est due non pas à une perte de **TOLne** mais à sa dilution dans la masse de la plante qui double durant la période considérée.

Quand l'organisme étudié grandit durant l'**exposition** ou la période d'observation, il semble pertinent de modifier (22) afin de prendre en compte le taux de croissance de l'organisme. Deux situations sont alors à considérer : si l'on dispose des valeurs de **TOLne**, il est alors possible d'utiliser (23). Si seulement le **TOLt** est disponible, des corrections complémentaires doivent être apportées pour prendre en compte les **cinétiques** différentes du **TOLne** et du **TOLe** qui composent le **TOLt** (24). Ces expressions permettent de modéliser l'évolution dans le temps du **TOLt** ou d'approximer l'effet du fractionnement isotopique dû au tritium. Ces relations sont pertinentes si, globalement, le métabolisme intègre l'eau dans des biomolécules.

$$\frac{dA_{\text{TOLne}}}{dw_{\text{dry\_matter}}} = \frac{d(C_{\text{neOBT}} \times m_{\text{dry\_matter}})}{d(m_{\text{dry\_matter}})} \times c_f = f \times C_{\text{HTO}} \quad (23)$$

avec :

$A_{\text{TOLne}}$  (en Bq) : l'activité tritium par plant/individu,

$w_{\text{dry\_matter}}$  (en L) : l'eau de combustion de la matière sèche par plant (ou équivalent eau),

$C_{\text{TOLne}}$  (en Bq L<sup>-1</sup> d'eau de combustion ou d'équivalent eau) : la concentration en **TOLne** de l'organisme,

$m_{\text{dry\_matter}}$  : la masse de matière sèche de l'organisme,

$c_f$  (sans dimension) : le facteur de correction (ou fraction d'hydrogène qui est non-échangeable dans la matière sèche),

$f$  (sans dimension) : le facteur de fractionnement isotopique de l'HTO (**TFWT**, HTO atmosphérique ou du sol) au **TOLne**

$C_{\text{HTO}}$  (Bq L<sup>-1</sup>) : l'activité volumique moyenne du **TFWT**, de l'HTO atmosphérique ou du sol durant la période considérée.

$$\frac{dC_{TOLt}}{dt} = \frac{dm_{dry\_matter}}{dt} \times \frac{(c_f \times f \times C_{HTO\_e} - C_{TOLt\_b} + g \times (1 - c_f) \times C_{HTO\_b})}{m_e} + g \times (1 - c_f) \times \frac{dC_{HTO}}{dt} \quad (24)$$

avec :

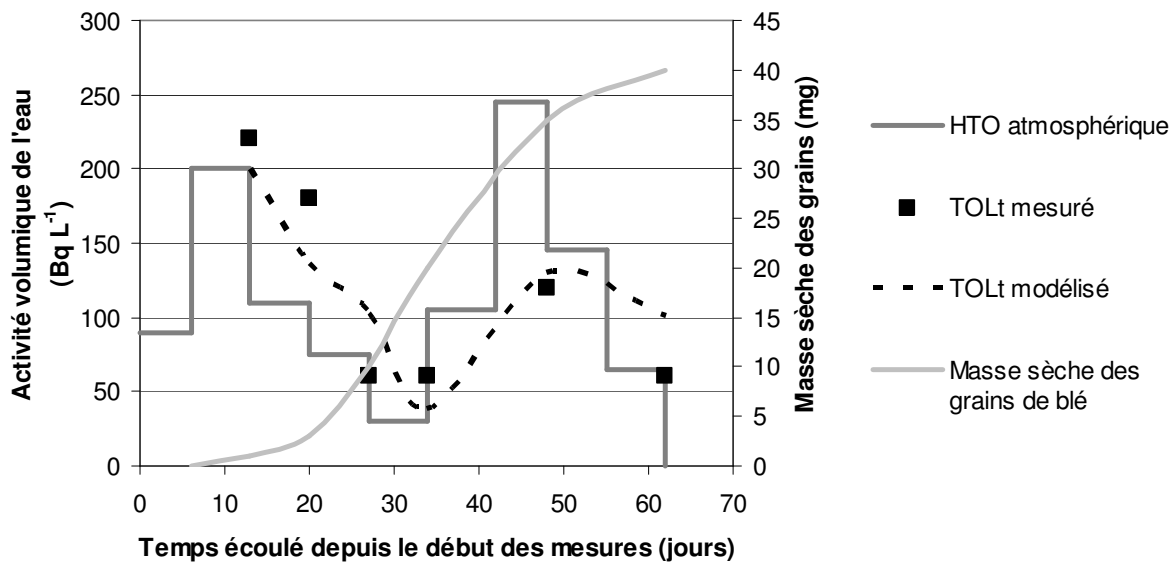
$C_{TOLt}$  (en Bq L<sup>-1</sup> d'eau de combustion ou d'équivalent eau) : la concentration en **TOLt** de l'organisme,

t (en h) : la durée de la période d'intégration du tritium considérée

g qui est le facteur de fractionnement isotopique entre l'HTO (**TFWT**, HTO atmosphérique ou du sol) au **TOLe**,

les indices b et e font respectivement référence aux valeurs en début et en fin de la période considérée.

Par exemple, la **Figure 3-17** présente l'évolution du **TOLt** dans les grains de blé durant leur croissance dans l'environnement immédiat de Valduc. Les données sont extraites de Guétat *et al.* (2013), hormis la masse des grains qui a été approximée à partir d'une modélisation de la croissance des grains présentée dans Dupont et Altenbach (2003). L'évolution modélisée du **TOLt** a été calculée à partir de (24), f et g étant considérés comme égaux à 1.



**Figure 3-17 : Evolution mesurée et modélisée du TOLt de grains de blé en fonction de l'activité volumique de l'eau atmosphérique et de la croissance des grains de blé**

Les relations (23) et (24) ne reflètent cependant pas parfaitement les processus qui sont en œuvre dans des parties d'un organisme ou d'un organe du fait que les flux de matière

(translocation de **TOL** depuis les feuilles vers les fruits, la respiration d'un organe, etc.) modifient la balance entre l'HTO et le **TOLne** dans l'organe considéré et décalent dans le temps l'évolution du **TOLne** dans celui-ci par rapport à l'**exposition**. On peut également observer cela dans Choi *et al.* (2002) : les épis et les grains ont des activités volumiques relativement constantes en **TOLne** après l'heure d'**exposition** au tritium alors que leur masse de matière sèche augmente continuellement après l'**exposition** au tritium (hormis dans la dernière situation d'**exposition**). Cela confirme que du tritium est continuellement incorporé par les épis et les grains, même bien après l'**exposition** au tritium.

### 3.4. Fractionnement isotopique après la photosynthèse

Dans le cas du tritium dans les plantes, la translocation peut être définie comme le processus biochimique par lequel les molécules tritiées synthétisées dans les feuilles (essentiellement des sucres) sont transférées vers les organes non-exposés (Belot, 1986). Le taux de translocation vers un organe dépend du stade de croissance de la plante ou de l'organe étudié : plus le taux de croissance est élevé, plus la concentration en tritium de cet organe sera importante (Spencer 1984; Arai, Takeda et al. 1985; Diabaté and Strack 1993; Strack, Diabaté et al. 1995; Diabaté and Strack 1997).

Pour quantifier la translocation de **TOL** vers les grains, Diabaté et Strack on défini le Translocation Index (TLI) comme étant le ratio du **TOLne** dans les grains au moment de la récolte (en Bq L<sup>-1</sup> d'eau de combustion) sur le **TFWT** dans les feuilles à la fin de l'**exposition** (en Bq L<sup>-1</sup>) (Diabaté et Strack, 1997). Ce ratio permet de comparer l'efficacité de la translocation du tritium entre différentes plantes sans avoir à considérer les éventuelles différences de type de métabolisme **photosynthétique** (C3, C4 ou CAM) entre les plantes étudiées ou encore de comparer l'efficacité du transfert en fonction du stade de croissance au cours duquel survient l'**exposition**.

Cependant, le TLI ne donne pas d'information sur le fractionnement isotopique durant les différents métabolismes qui se déroulent entre l'incorporation du HTO jusqu'au **TOL** final. Compte tenu de la grande variété de voies métaboliques et les contributions variables de l'eau

du sol et de l'eau atmosphérique à l'eau libre de la plante, mesurer les effets du fractionnement isotopique semble possible uniquement dans des conditions de laboratoire bien définies où notamment l'HTO du sol et de l'atmosphère est bien contrôlée.

Chez les animaux, les difficultés pour mesurer l'activité spécifique d'une molécule donnée synthétisée après l'ingestion de nourriture tritiée (voir par exemple Arai *et al.*, 1985 ; Jean-Baptiste *et al.*, 2009 ; Putnam, 1971) ou de molécules tritiées bien identifiées (voir Takeda, 1991 ; Taylor, 2008) permettent de comprendre pourquoi il y a seulement des données globales sur le **TOL** synthétisé ou excrété. Il est donc impossible d'évaluer le fractionnement isotopique dans les différentes voies métaboliques concernées. Du fait de la multitude de sources de dilution et d'excrétion du tritium, même dans des situations d'**exposition** chronique et d'équilibre, le fractionnement isotopique ne peut pas être estimé de manière globale pour un organisme ou un organe. Considérer chaque métabolisme, un par un, semble être la seule méthode permettant de vraiment mesurer les effets du fractionnement isotopique. Cependant, la comparaison de la tritiation entre organes (Kirchmann *et al.*, 1977) ou molécules (Commerford *et al.*, 1977, 1983 ; Kirchmann *et al.*, 1977) est une autre manière d'évaluer les concentrations relatives (ou dilutions) du tritium au sein d'un organisme.

### 3.5. Conclusions

Le fractionnement isotopique de l'hydrogène constitue un sujet majeur de radiotoxicologie et son étude nécessite de prendre en compte des données et des concepts de radioécologie. La mise en évidence et la quantification de phénomènes de **discrimination isotopique** devraient permettre de savoir si certains compartiments sont susceptibles de concentrer le tritium.

Cependant, cette évaluation nécessite de prendre de nombreuses précautions compte tenu de l'omniprésence de l'hydrogène dans l'environnement et de la multiplicité de ses sources pour un compartiment donné. L'**ubiquité** et la grande mobilité du tritium rendent également l'étude du fractionnement isotopique délicate. Des exemples de fractionnement isotopique entre le tritium et le **protium** sont cependant cités sur des mécanismes simples (McFarlane, 1976 ; Weinberger et Porter, 1953), notamment dans les changements de phase de l'eau, quelle que soit l'échelle d'observation (Richard, 2006 ; Risi, 2009).



Lors de l'évaluation de la **discrimination isotopique** entre 2 compartiments, il apparaît qu'il est de première importance de considérer correctement la taille des compartiments étudiés. Le calcul du RSA par exemple (rapport des activités volumiques de l'eau de combustion de **TOLne** et de l'HTO) ne permet pas d'appréhender le fractionnement isotopique correctement si on n'applique pas un facteur correctif afin de rapporter l'activité volumique de l'eau de combustion du **TOLne** uniquement à la part non-échangeable de l'hydrogène. Nous avons montré que cette correction peut modifier de 5 à 50 % l'estimation ainsi obtenue.

Certains modèles emploient un facteur de correction (généralement autour de 0,6) pour estimer la part de **TOLne** synthétisé à partir d'HTO (Davis *et al.*, 2005 ; IAEA, 2003, 2009 ; Le Dizès, 2004, 2005). Ce facteur est alors assimilé à un facteur de **discrimination isotopique**. Compte tenu des conditions d'utilisation de ces modèles, on peut également appliquer le facteur de correction qui permet la prise en compte de la dilution du **TOLne** dans la matière sèche induite par le **rinçage isotopique**. Le facteur de **discrimination isotopique** nécessaire pour faire correspondre les modèles aux valeurs expérimentales est alors très proche de 1.

La moyenne du RSA dans le **Tableau 11** est de  $0,95 \pm 0,58$ . Une fois corrigé, ce ratio atteint  $1,32 \pm 0,83$ . Il est alors cohérent avec la valeur moyenne des données environnementales présentée dans (Jean-Baptiste *et al.*, 2009) ( $1,92 \pm 1,42$ ). Quoi qu'il en soit, le ratio entre **TOLne** et HTO reste proche de 1 ce qui signifie peu ou pas de discrimination isotopique. De plus, la multitude de sources d'hydrogène induit une possibilité importante de dilution du tritium dans les écosystèmes ou les organismes, effaçant alors les possibles effets d'une discrimination isotopique positive.

Dans cette section, nous mettons en évidence la très grande multiplicité des termes synonymes (par exemple **TFWT** et **TWT** ou **OBTne** et **CBT**), des sens différents pour un même terme (**OBT** signifiant tantôt **TOLt**, **TOLne** ou **TOL** sans autre distinction) ou des unités et ratios utilisés. Cela rend le travail de comparaison des résultats fastidieux voire impossible lorsque la description des modes opératoires est ambiguë. Il apparaît donc impératif d'uniformiser le vocabulaire et la terminologie. Nous proposons, comme dans ce manuscrit, d'utiliser les indices ne, e et t pour préciser la fraction de **TOL** que l'on considère

(respectivement pour les **TOL** non-échangeable, échangeable ou total) et de réserver **TOL** sans indice pour les situations (rares) où la forme n'a pas d'incidence sur le propos. Ajouter un indice au **RSA**, pour préciser les termes comparés, permettrait également une parfaite compréhension de sa signification (exemples :  $\text{RSA}_{\text{TOLne/TFWT}}$  ou  $\text{RSA}_{\text{TOLi/HTOatm}}$ ).

## 4. Autre méthode de traitement de l'eau de combustion

Afin de gagner du temps dans le traitement de nos échantillons, une méthode a été développée pour clarifier l'eau de combustion et éliminer les autres molécules susceptibles de « quencher ». Cette méthode a été testée selon le protocole présentée à la Partie 2.1.1.3.2.

Les eaux de combustion des échantillons de 60 g présentaient tous une coloration marquée mais une seule phase. Une fois traités, tous les échantillons étaient limpides. Le pH des échantillons dont il n'a pas été neutralisé était systématiquement inférieur. Lors du comptage, aucun échantillon n'a présenté de chimiluminescence. Le rendement observé sur les échantillons traités avec du charbon actif est resté supérieur à 20 % (par comparaison, les meilleurs rendements observés, tout échantillon confondu (y compris l'eau de référence), sont de 23 %).

Sur les 6 échantillons traités en parallèle par la méthode classique et par charbon actif, un échantillon traité selon la deuxième méthode a présenté une luminescence rendant impossible la mesure. Sur les autres, la valeur obtenue après traitement par charbon actif est en moyenne 2,44 % inférieur à celle obtenue selon la méthode classique qui paraît négligeable face à l'incertitude de mesure estimé sur ces échantillons (entre 15 et 28 %).

Compte tenu de ces résultats, et parce que le temps de traitement classique n'était pas compatible avec l'échéance de notre étude, une centaine d'échantillons a été traitée par charbon actif. Sur ces derniers, 6 échantillons (dont celui mentionné dans le paragraphe précédent) ont présenté une luminescence incompatible avec une mesure de l'activité volumique. Ce phénomène a systématiquement été observé sur les échantillons ayant

nécessité beaucoup plus de peroxyde de sodium que la moyenne pour neutraliser le pH (jusqu'à 10 fois plus).

En conclusion, le traitement au charbon actif est une méthode permettant de gagner beaucoup de temps pour obtenir une activité volumique de l'eau de combustion d'un échantillon. Cependant, une luminescence parasite peut empêcher la mesure suite à ce traitement seul. Une fois l'eau de combustion mélangée avec le liquide scintillant, il est très difficile de séparer les deux liquides. Qui plus est, ce mélange peut avoir modifié l'activité volumique de l'eau de combustion par **échange labile** avec les molécules composant le liquide scintillant. Ce risque doit être pris en compte lorsque le choix est fait de mettre en œuvre ce protocole. Une solution pour ne pas risquer de perdre la possibilité de mesure est de prévoir la combustion d'une masse d'échantillon suffisante pour avoir la possibilité de traiter classiquement l'échantillon en cas de luminescence suite au traitement par charbon actif. Enfin, des répétitions de mesure appariée entre de l'eau de combustion traitée selon les deux techniques sont nécessaires pour confirmer les résultats obtenus ici.

Dans la Partie 3, nous avons mis en place des éléments méthodologiques pour la préparation, la mesure et l'analyse que nous mettons en œuvre dans l'étude environnementale afin de produire des données pertinentes et univoques que nous exposons dans les parties suivantes.







## **Partie 4. Le marquage des végétaux par le tritium**

Par la **photosynthèse**, les plantes sont particulièrement aptes à intégrer du tritium sous forme organique à partir d'eau tritiée. De plus, en tant que producteurs primaires, elles sont à la base de la plupart des chaînes alimentaires terrestres. La compréhension des mécanismes par lesquels les végétaux intègrent le tritium est donc de première importance et a déjà été l'objet de nombreux travaux. Parmi eux, les travaux de Boyer et al. ont exploré la tritiation d'un légume feuille, la laitue (*Lactuca sativa*), dans des conditions d'exposition variées afin de mettre en évidence l'influence de divers paramètres environnementaux (température, flux lumineux, activité tritium de l'atmosphère, etc.) sur le **TFWT** et le **TOLt** (Boyer *et al.*, 2010). Les travaux faisant l'objet de la présente partie ont essentiellement visé à étudier l'effet de différents paramètres sur la synthèse de **TOL** par des espèces cultivées à proximité du centre de Valduc : la localisation, l'espèce et la croissance. Nous avons également comparé la tritiation de composants organiques que nous avons séparés d'épis d'orge et de blé ainsi que des siliques de colza.

Notre étude ayant porté sur des **cultivars**, toutes les plantes prélevées sont des plantes annuelles, dont tout le cycle de croissance se reproduit chaque année. Il en découle qu'hormis la semence (produite au moins la saison précédente), toute la matière organique constitutive de la plante est produite au cours des quelques mois qui séparent la germination et la récolte. Il est ainsi plus commode de comparer la tritiation des échantillons avec les conditions environnementales.

Compte tenu de la situation du centre de Valduc, il est pertinent de considérer le site comme l'unique **émissaire** de tritium anthropogénique dont l'influence est sensible dans nos échantillons. Nous considérons ici qu'il s'agit d'un **émissaire** ponctuel et continu. Ainsi, seules les conditions météorologiques ainsi que la topographie des environs du centre de Valduc font varier les activités atmosphériques auxquelles sont exposées les cultures échantillonnées.

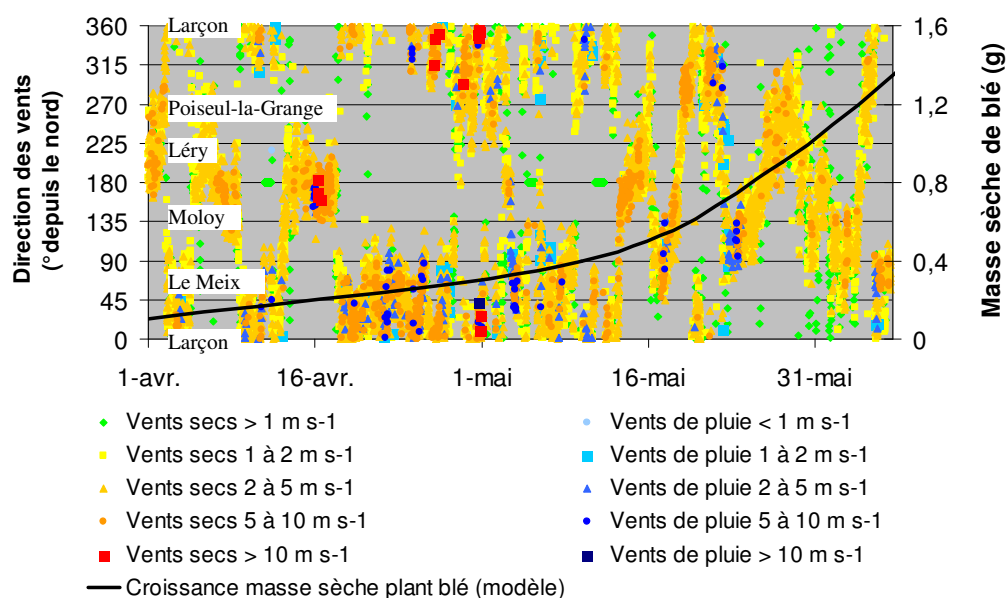


# 1. 1<sup>ère</sup> campagne de prélèvements

## 1.1. TOLne et croissance

Nous considérons ici que la période de croissance des végétaux a commencé au 1<sup>er</sup> avril 2012. Pour le blé d'hiver et le colza d'hiver, semés respectivement en décembre et en septembre 2011, cela représente une approximation qui reste négligeable en termes de biomasse : on estime que moins de 10 % de la biomasse sèche prélevée le 14 juin a été produite avant le 1<sup>er</sup> avril.

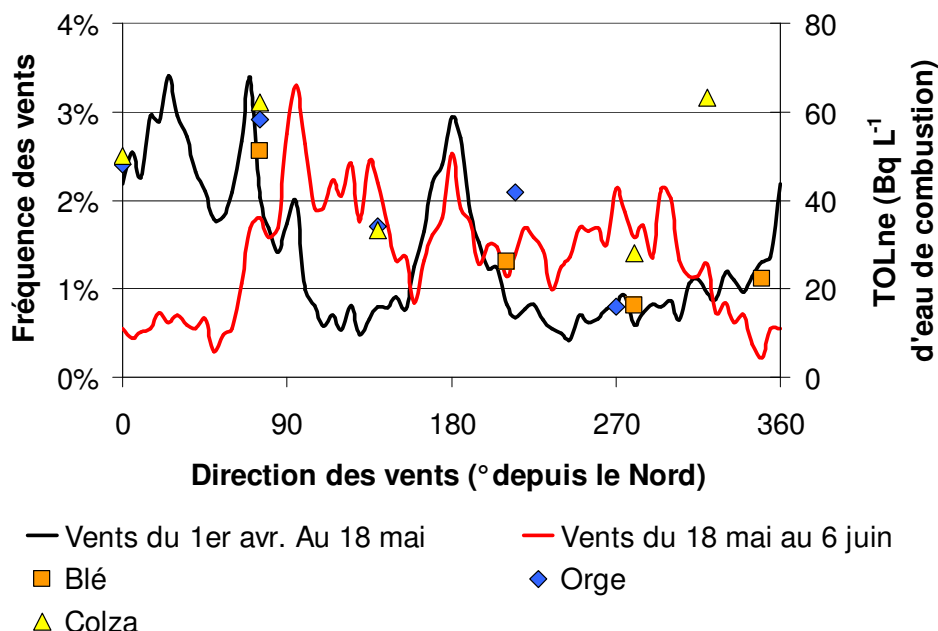
La modélisation de la courbe de croissance des **cultivars** considérés (en noir sur la Figure 4-1) est basée sur la croissance de plants de blé suivis en 2013. Sur la période d'étude, on observe qu'elle peut être schématisée par deux croissances linéaires : une qui court du 1<sup>er</sup> avril 2012 au 18 mai 2012 et la deuxième, dont la pente est supérieure et correspond au début de la phase de croissance exponentielle, qui court du 18 mai jusqu'au prélèvement du 6 juin 2012.



**Figure 4-1 : Chronique des directions et vitesses de vents du 1<sup>er</sup> avril au 6 juin 2012 et modélisation de la croissance des cultivars durant cette période (blé d'hiver pris comme exemple)**

Ainsi, en comparant les activités volumiques du **TOLne** aux fréquences de vent sur chacune de ces périodes, on obtient la **Figure 4-2**. On observe sur celle-ci que la corrélation entre

l'orientation des vents durant la période considérée et l'activité volumique est bonne (test de Spearman :  $p\text{-value} < 0,05$ ). La corrélation entre l'activité du **TOLne** et la première période de croissance considérée apparaît meilleure.



**Figure 4-2 : Fréquence des origines des vents entre le 1<sup>er</sup> avril et le 6 juin 2012 et activités volumiques de l'eau de combustion du TOLne des échantillons prélevés le 6 juin 2012 en fonction du lieu de prélèvement**

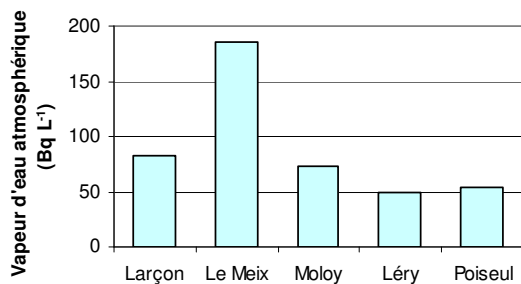
Bien qu'une corrélation entre l'activité volumique de l'eau de combustion des végétaux après **échange labile** et l'exposition aux vents venant de Valduc ait été mise en évidence, les paramètres de l'étude ne permettent pas de tirer des conclusions sur les constantes de transferts entre la vapeur d'eau atmosphérique et la matière sèche synthétisée. Pour cela, il est nécessaire de suivre l'évolution de la masse sèche des végétaux échantillonnés au cours de l'étude, d'avoir des données précises sur l'activité de l'eau atmosphérique au niveau des points de prélèvements et de pouvoir mesurer l'activité tritium de la matière sèche à plusieurs étapes de la croissance.

## 1.2. TOLne en fonction de l'espèce prélevée

Trois espèces de **cultivars** (le blé, l'orge et le colza) ont été prélevées en 6 zones réparties autour de Valduc (près de Larçon, de Le Meix, de Moloy, de Léry, de Poiseul-la-Grange et d'Echalot). Afin de limiter les variations liées à la distance et/ou à la topographie au sein de

chaque zone de prélèvement, la distance entre échantillons a été limitée autant que possible, en fonction des cultures en place. Seule la mesure du **TOLne** du colza ayant été obtenue parmi les échantillons prélevés à Echalot, cette zone n'est pas considérée dans cette section.

A partir des conditions météorologiques mesurées entre le 1<sup>er</sup> avril et le 6 juin 2012, l'activité volumique moyenne de la vapeur d'eau atmosphérique a été calculée pour chacun des points de prélèvements en utilisant le code de calcul GASCON (Guétat *et al.*, 2004) (**Figure 4-3**).



**Figure 4-3 : Activité volumique moyenne de la vapeur d'eau atmosphérique aux différents points de prélèvements obtenue par le code calcul GASCON pour la période entre le 1<sup>er</sup> avril et le 18 juin 2012**

La **Figure 4-4** est établie afin de comparer l'influence de la localisation des prélèvements sur chacune des 3 espèces suivies. On observe qu'au sein de chaque espèce, les valeurs extrêmes de l'activité volumique de l'eau de combustion du **TOLne** varient du simple au double (voire triple pour l'orge). Les variations du **TOLne** dans les 3 espèces en fonction du lieu de prélèvement sont cependant similaires : avec par exemples les valeurs minimales obtenues à Poiseul-la-Grange et les valeurs maximales obtenues à Le Meix.

On observe également la bonne corrélation de la distribution des activités volumiques des eaux de combustion de nos échantillons avec celle de la vapeur d'eau atmosphérique estimée avec GASCON pour chacune des zones de prélèvements. Ces valeurs diffèrent globalement d'un facteur 2,5 (écart-type : 0,85). Pour la période considérée, les activités volumiques de la vapeur d'eau atmosphérique mesurées sur les stations de Léry et Molo sont deux fois inférieures à celles calculées par GASCON pour ces-mêmes stations. En corrigeant l'activité volumique de l'eau de combustion du **TOLne** par la contribution de l'hydrogène non-échangeable à l'hydrogène total (environ 0,7) comme proposé dans la **Partie 3.3.3.2**, et l'activité évaluée par GASCON d'un facteur 2 (compte tenu des différences observées entre le

modèle et les mesures pour les stations de prélèvements), les activités volumiques comparées sont alors très proches (moins de 15 % de différence).

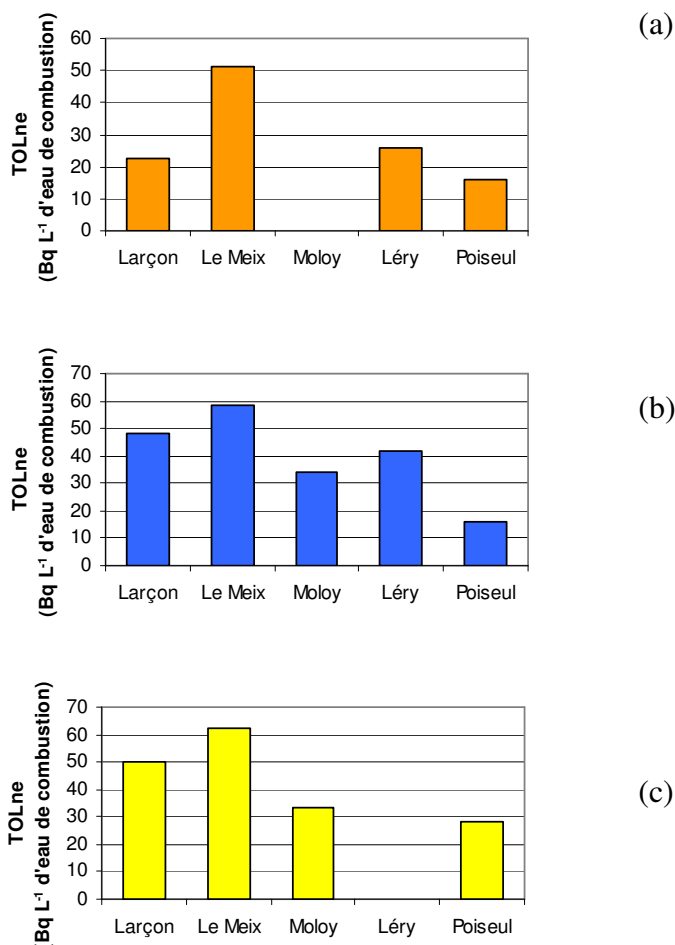


Figure 4-4 : TOLne mesuré dans le blé (a), l'orge (b) et le colza (c) en fonction du lieu de prélèvement

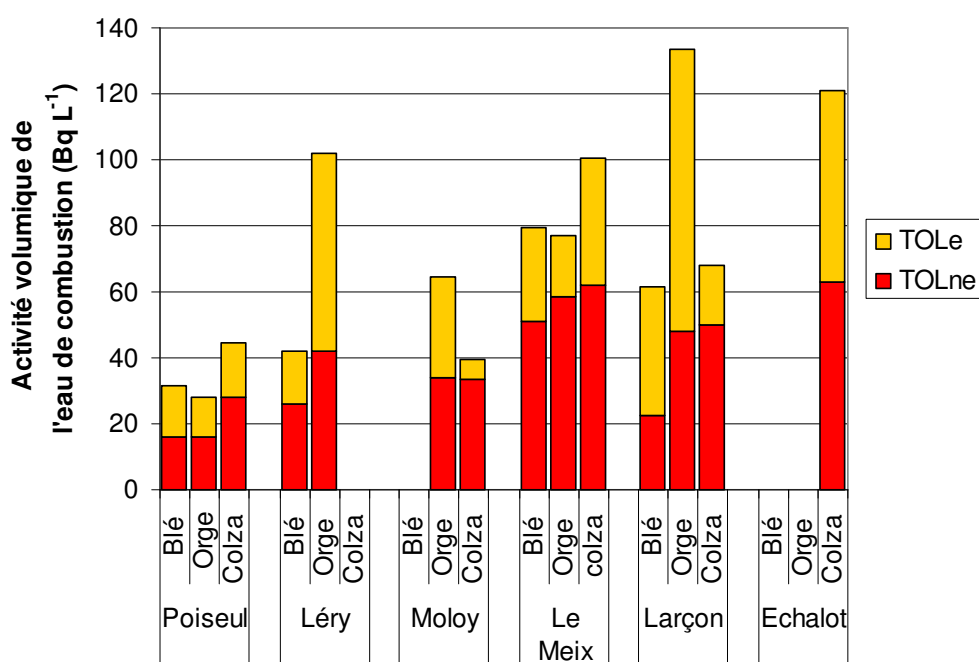
Le **TOLne** intégrant l'activité tritium « vue » par la plante au cours de sa croissance, cela explique que les 3 espèces de plantes annuelles considérées aient une intégration similaire du tritium dans la fraction non-échangeable de leur matière sèche. Que les prélèvements aient été réalisés tôt dans la période de croissance a comme conséquence que les échantillons sont essentiellement constitués de feuilles et de tiges, limitant ainsi les différences entre espèces. De plus, les 3 espèces prélevées au cours de cette campagne étant des plantes en C3, les différences de métabolismes sont peu significatives.

Compte tenu qu'on considère que le **TOLne** dans un végétal intègre le tritium au cours de sa croissance (voir Partie 1.3.3.2), seuls le métabolisme, la morphologie et la croissance des plantes considérées sont susceptibles d'induire des différences marquées de l'activité du

**TOLne** entre espèces au cours d'un prélèvement simultané et dans des conditions d'expositions identiques.

### 1.3. TOLe et TOLne

Sur chacun des 14 échantillons prélevés, le **TOLt** et le **TOLne** ont été mesurés. Il a ainsi pu être déduit le **TOLe**. L'ensemble des résultats est présenté en **Figure 4-5**.



**Figure 4-5 : TOLne et TOLe mesurés sur les échantillons prélevés autour de Valduc le 6 juin 2012**

Sur cette figure, on peut observer que le rapport entre le **TOLe** et le **TOLne** est très hétérogène : le **TOLne** représentant entre 34 % et 84 % du **TOLt**. Même au sein d'une même espèce ou d'un même lieu de prélèvement, ces différences sont très marquées : le **TOLne** de l'orge à Larçon représente 36 % du **TOLt** alors que celui du colza en constitue près de 74 % et qu'à Le Meix le **TOLne** de l'orge représente près de 76 % du **TOLt**. Aucune tendance ne se dégage de ces résultats.

Contrairement au **TOLne** qui apparaît comme essentiellement lié à l'activité atmosphérique en tritium, le **TOLe** est la résultante de la mise à l'équilibre isotopique des fractions

échangeables de l'hydrogène de la matière sèche de la plante avec les autres hydrogènes labiles, essentiellement ceux de l'eau libre.

Comme vu dans la Partie 1.3.3.1 ainsi que dans la Partie 3.3.1, cette eau libre n'est pas homogène au sein d'une plante donnée : les contributions relatives de l'eau du sol et de l'eau atmosphérique sont variables entre les organes. Or, dans nos échantillons, l'influence de l'eau du sol n'est pas apparente, soit parce que sa contribution à l'eau libre de la plante est faible dans les conditions de l'étude soit parce que les activités volumiques de l'eau du sol et de la vapeur d'eau de l'air sont suffisamment proches pour que leur contribution respective ne soit pas identifiable. Quoi qu'il en soit, la morphologie de la plante, par la simple modulation de la contribution de chacun des organes à la matière sèche, influe sur le **TFWT** global et donc sur le **TOLe**.

On remarque qu'une grande part de la variabilité du rapport **TOLe/TOLt** est due aux échantillons d'Orge, notamment ceux de Léry, Moloy et Larçon. Des **demi-vies** biologiques différentes entre les espèces prélevées ainsi que des contributions variables de l'eau atmosphérique et de l'eau du sol à l'eau libre de la plante selon l'espèce considérée sont parmi les hypothèses susceptibles d'expliquer ces observations.

Enfin, les échanges entre les hydrogènes labiles (qu'ils soient portés par de l'eau, des sels ou des molécules organiques) sont très rapides et tendent vers l'égalité du rapport isotopique entre les compartiments. Les conditions de stockage et de conservation doivent donc permettre d'assurer une absence d'échange entre le **TOLe** de l'échantillon et l'environnement dès le prélèvement et jusqu'à la mesure. Cela est particulièrement sensible lorsque les ambiances du laboratoire et du lieu de prélèvement sont très différentes.

Ainsi, le **TOLe** apparaît comme un paramètre soumis à l'influence de nombreux paramètres en conditions environnementales. Il est donc impossible dans ces conditions de déduire la valeur du **TOLne** à partir de la seule valeur du **TOLt**. Bien qu'imparfaites, les seules méthodes pour estimer la valeur du **TOLne** sont donc de procéder à l'**échange labile** sur la matière sèche et de mesurer le **TOLne** ou de déduire du **TOLt** une activité correspondant à

celle du **TFWT** rapportée à la fraction d'hydrogène échangeable, à condition alors de connaître ces deux paramètres (Jean-Baptiste *et al.*, 2007).

Afin d'obtenir des résultats plus fins et permettant de modéliser le transfert du tritium de l'atmosphère vers le **TOL**, plusieurs améliorations possibles ont été identifiées. En suivant la croissance des végétaux suivis, il est alors possible de quantifier la relation entre l'évolution de la biomasse, l'activité tritium de l'environnement et la synthèse de **TOLne**. En choisissant des points de mesures à proximité immédiate des stations de prélèvements, cela permet d'utiliser directement les valeurs obtenues dans le cadre de la surveillance environnementale du site de Valduc. La réduction des points de prélèvements est également nécessaire pour pouvoir traiter assez d'échantillons afin d'assurer le suivi au cours du temps.

## 2. Deuxième campagne de prélèvements

Quatre zones ont été déterminées pour cette campagne de prélèvements, chacune étant située à proximité d'une des quatre stations de prélèvements extérieures au site du CEA Valduc. Afin de limiter le nombre d'échantillons à traiter et compte tenu des résultats présentés dans la section 1, deux espèces aux périodes de croissance et de maturation proches ont été échantillonnées au cours de l'expérience : du blé d'hiver (à Echalot et à Moloy) et de l'orge d'hiver (à Salives et à Léry). A Moloy, de la luzerne et du colza ont également été prélevés afin de mesurer d'éventuelles variations liées à l'espèce au cours de la croissance.

En complément, sur un dernier échantillon prélevé juste avant la récolte, les épis de blé et d'orge ont été traités afin de séparer le gluten, l'amidon, les éléments solubles et les parties fibreuses de l'épi. Sur ces quatre fractions, seul le **TOLne** a été mesuré. De l'huile a été extraite des grains de colza. Sa teneur en **TOLne** a été mesurée et comparée à celle des cosses.

Quatre paramètres ont été mesurés au cours de la croissance :

- la masse fraîche moyenne d'un plant puis, dès que cela a été possible, l'épi traité séparément du reste de la plante,
- la masse sèche moyenne d'un plant puis de l'épi et du reste du plant,
- le tritium total,
- le **TOLne**.

Les prélèvements se sont déroulés entre le 22 avril et le 19 août 2013.

## **2.1. Evolution du tritium total**

La **Figure 4-6** synthétise les mesures du tritium total de nos prélèvements et permet la comparaison avec l'activité atmosphérique mesurée sur chacune des stations de prélèvements du CEA Valduc.

On observe que pour chacune des stations considérées, les valeurs de tritium total des échantillons fluctuent entre les minimums et les maximums des mesures hebdomadaires de l'HTO atmosphérique. Pour l'essentiel des points, l'activité des échantillons suit la même évolution que l'activité atmosphérique. Seuls 7 points divergent nettement de l'évolution de l'activité volumique de la vapeur d'eau de l'air : 1 échantillon du 3 mai, 3 du 21 mai, 1 du 3 juin et 2 du 17 juin.

En l'absence de donnée météorologique durant la journée du 3 mai, il n'est pas possible d'expliquer l'origine de la différence observée entre l'activité volumique de l'eau atmosphérique et le tritium total du blé prélevé à Moloy.



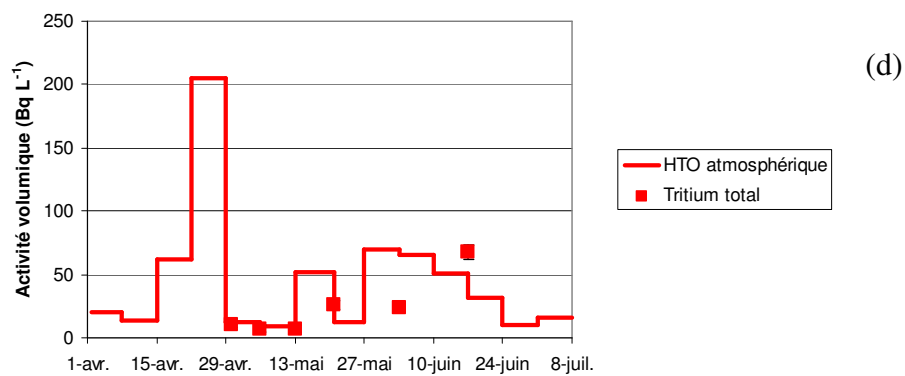
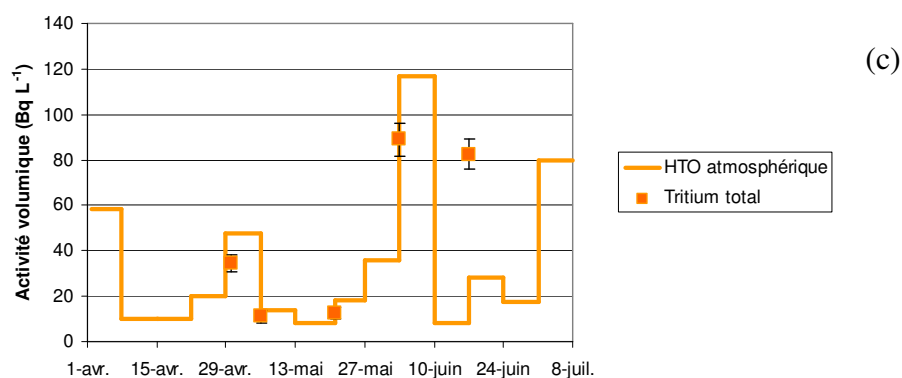
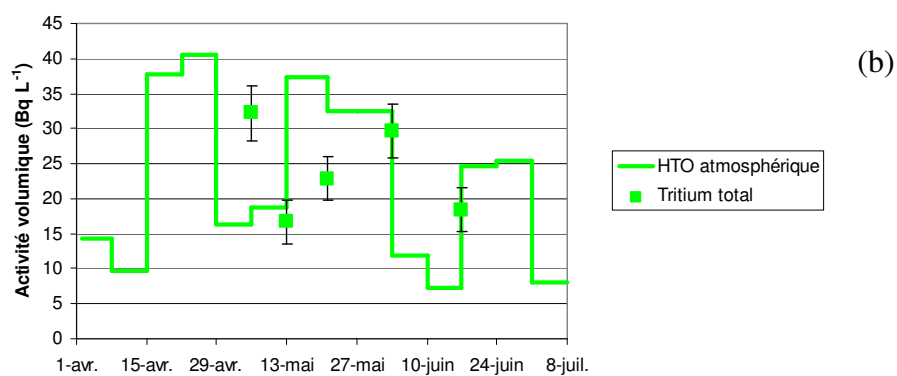
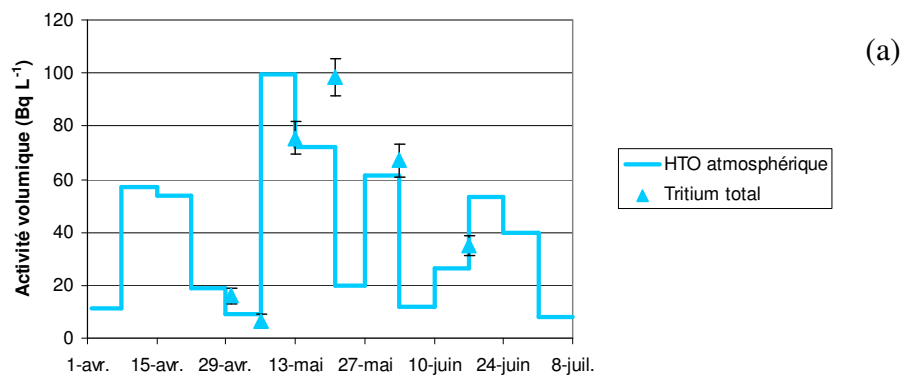


Figure 4-6 : Activité volumique de l'HTO atmosphérique et du tritium total des échantillons prélevés  
(a) Orge à Salives – (b) Blé à Moly – (c) Orge à Léry – (d) Blé à Echalo

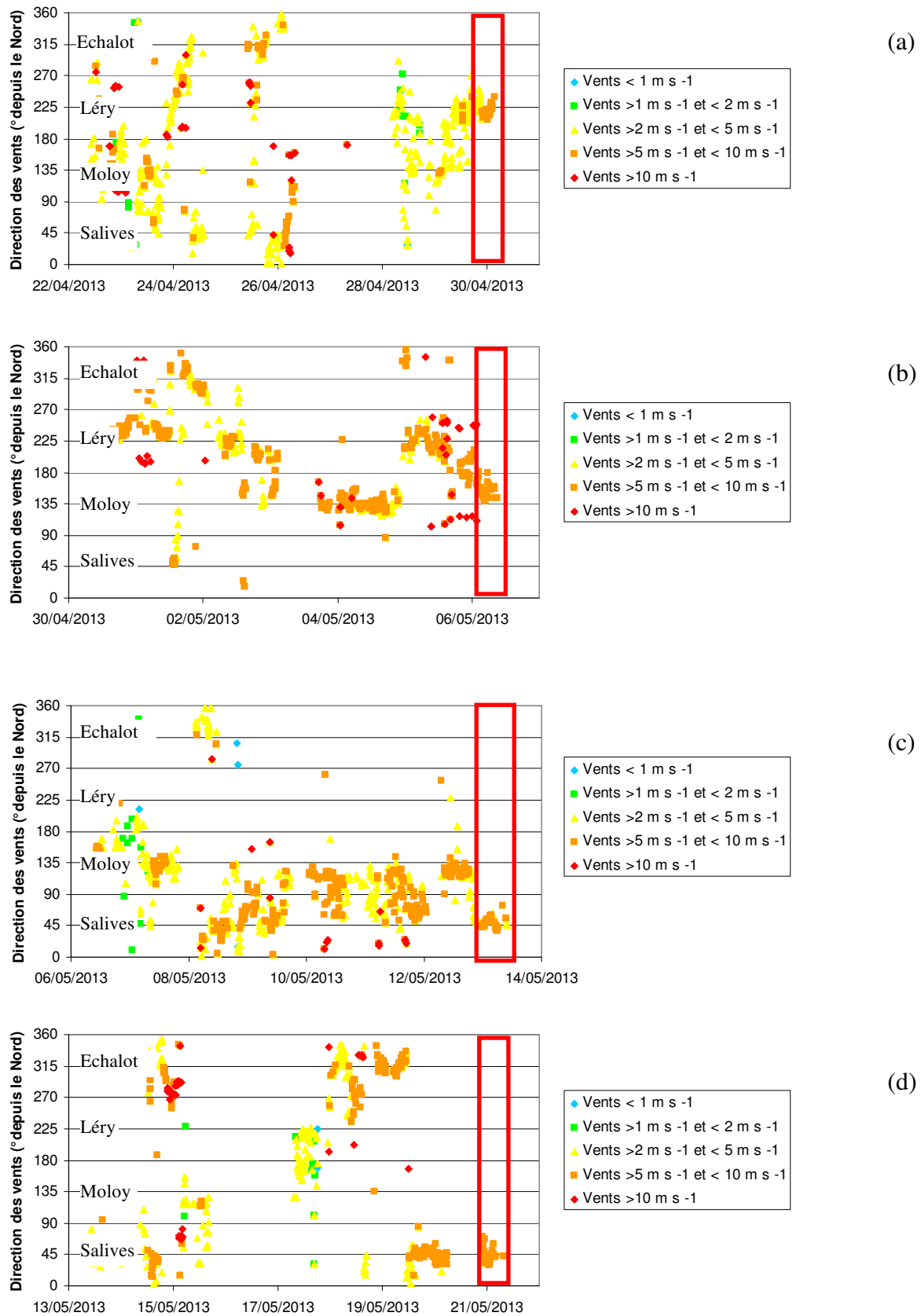
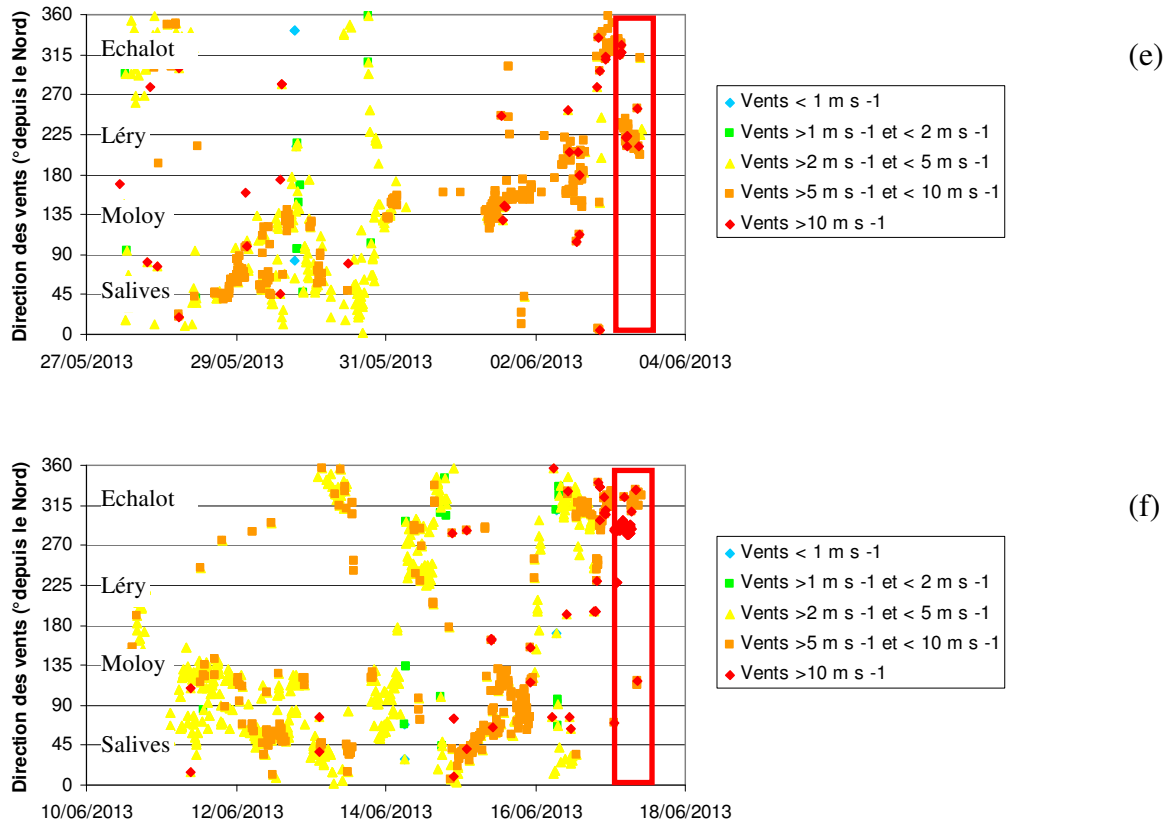


Figure 4-7 : Vitesses et directions de vents mesurés à Valduc au cours des périodes de prélèvements atmosphériques. Les cadres rouges délimitent les 12 heures qui ont précédé les prélèvements.



**Figure 4-7 (suite) : Vitesses et directions de vents mesurés à Valduc au cours des périodes de prélèvements atmosphériques. Les rectangles rouges délimitent les 12 heures qui ont précédé les prélèvements.**

Durant les heures qui ont précédé les prélèvements du 21 mai, les conditions météorologiques ne représentent qu'une des deux principales composantes de la rose des vents de la semaine de prélèvements : celle qui est en direction de Salives sans celle en direction d'Echalot (**Figure 4-7 d**).

Durant les heures qui ont précédé les prélèvements du 3 juin, les vents sont orientés vers Léry alors que durant la semaine de prélèvement atmosphérique les vents dominants sont plutôt orientés vers Salives et Moloy (**Figure 4-7 e**). Cette observation concorde avec la comparaison entre les activités atmosphériques et celles du tritium total des échantillons.

Enfin, avant les prélèvements du 17 juin, les vents ont été essentiellement orientés vers le Nord-Ouest alors que durant la semaine de prélèvements ils ont été principalement orientés vers Nord-Nord-Est/Est-Nord-Est (**Figure 4-7 f**). Il y a une bonne concordance également entre ces observations et l'activité en tritium total mesurée sur les échantillons de Lery et

d'Echalot où l'activité a été plus élevée que celles de l'eau atmosphérique prélevée aux stations correspondantes. En revanche, les activités en tritium total mesurées sur les échantillons de Salives et Moloy sont également plus élevées que celles de l'eau atmosphérique alors que le vent dans les heures précédant l'échantillonnage ne les exposait pas au panache. On peut supposer que cela soit dû à l'effet « tampon » de l'hydrogène non-échangeable de la matière sèche synthétisée au cours des semaines précédentes durant lesquelles l'activité atmosphérique a été sensiblement plus élevée que dans la semaine précédent le prélèvement du 17 juin.

Lorsqu'il y a une bonne adéquation entre les mesures du tritium total des échantillons et les prélèvements atmosphériques, on observe que l'exposition aux vents de la station considérée durant la période de **barbotage** est bien représentée au cours des quelques heures qui précèdent le prélèvement.

Compte tenue de la **demi-vie** biologique de l'eau libre qui représente entre 40 % et 82 % de la masse fraîche de nos échantillons (de l'ordre de quelques dizaines de minutes) et de celle de l'hydrogène échangeable qui représente près d'un tiers de l'hydrogène de la matière sèche (de l'ordre de la demi-journée voire de la journée), la bonne corrélation entre les deux activités mesurées résulte de la relative stabilité des conditions de vents à l'échelle de la semaine.

En raison des contraintes propres à une étude environnementale (nombre de prélèvements, conditions non contrôlées, variabilité des paramètres de croissance, etc.) et faute d'outils permettant une bonne représentativité des conditions pédologiques à l'échelle de la semaine ou des quelques heures qui précèdent le prélèvement, l'eau du sol n'a pas été suivie. Cependant, des données de suivi de l'activité de l'eau du sol, de celle de l'eau atmosphérique et de l'eau de pluie sur 4 stations proches de Valduc entre le 15 octobre 1998 et le 10 janvier 2001 montrent que l'activité de l'eau du sol est, dans 3 stations, inférieure à l'activité atmosphérique mesurée. Toutefois, l'activité volumique de l'eau du sol dans la 4<sup>ème</sup> station (au Nord de Valduc) est nettement supérieure à l'activité atmosphérique et à l'eau météoritique sans que ce phénomène soit expliquée (CEA/DASE, com. pers). Une relation a été établie entre l'activité volumique moyenne des 3 compartiments d'eau suivis (eau atmosphérique, eau de pluie et eau du sol (Guétat *et al.*, 2013). Au regard des résultats présentés dans la **Figure 4-6**, et de leur homogénéité, on peut considérer ici que, si les

activités volumiques des eaux du sol et atmosphériques différent sensiblement, l'influence de l'eau du sol est faible devant celle de l'eau atmosphérique sur le tritium total, notamment du fait de la forte humidité relative de l'air sur la période de suivi (80 % en moyenne entre le 1<sup>er</sup> avril et le 8 juillet).

## 2.2. Comparaison de la tritiation de différents composants

Une des questions encore peu traitées dans la littérature sur l'intégration du tritium par les végétaux est celle de l'homogénéité de la tritiation des molécules dans un organisme ou organe donné. Afin d'apporter des éléments de réponse, nous avons séparé le gluten et l'amidon d'épis de blés et d'orges prélevés dans chacune des 4 stations dans lesquelles s'est déroulé le suivi de la tritiation au cours de la croissance. Lorsque cela a été possible (notamment du fait de la quantité d'échantillon disponible après traitement), nous avons également mesuré l'activité en **TOLne** des fibres ainsi que de la fraction soluble prélevée. Deux prélèvements complémentaires ont été réalisés le 19 août : un à Moloy, pour compenser la faible quantité de matière sèche obtenue lors du traitement des épis de juillet encore très immatures et un à Léry, dans un champ voisin de la station de prélèvement d'orge, pour y prélever du blé. Une expérience comparable a été menée sur le colza à Moloy (prélevé en juillet) : l'huile a été extraite des graines de colza et l'activité volumique de son eau de combustion a été comparée à celles des **cosses**.

Les résultats de ces mesures sont présentés **Figure 4-8** et **Figure 4-9**. Les barres d'erreurs présentées figurent l'incertitude de mesure sur l'ensemble de l'expérience. Elles tiennent compte notamment de l'incertitude de mesure par scintillation liquide et, le cas échéant, des dilutions nécessaires pour réaliser le comptage de certains échantillons faute de masse d'eau de combustion suffisante (pour les fibres des épis de Salives notamment).

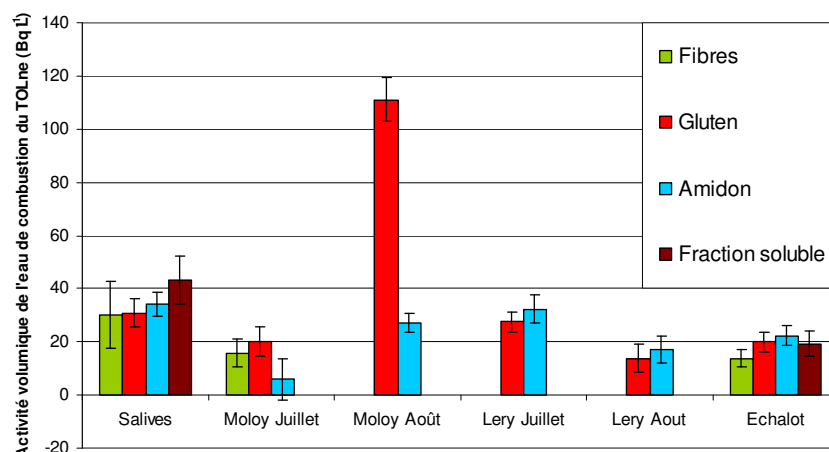


Figure 4-8 : Comparaison des activités volumiques de l'eau de combustion des fibres, du gluten, de l'amidon et des fractions solubles d'épis de blé et d'orge après rinçage isotopique (TOLne)

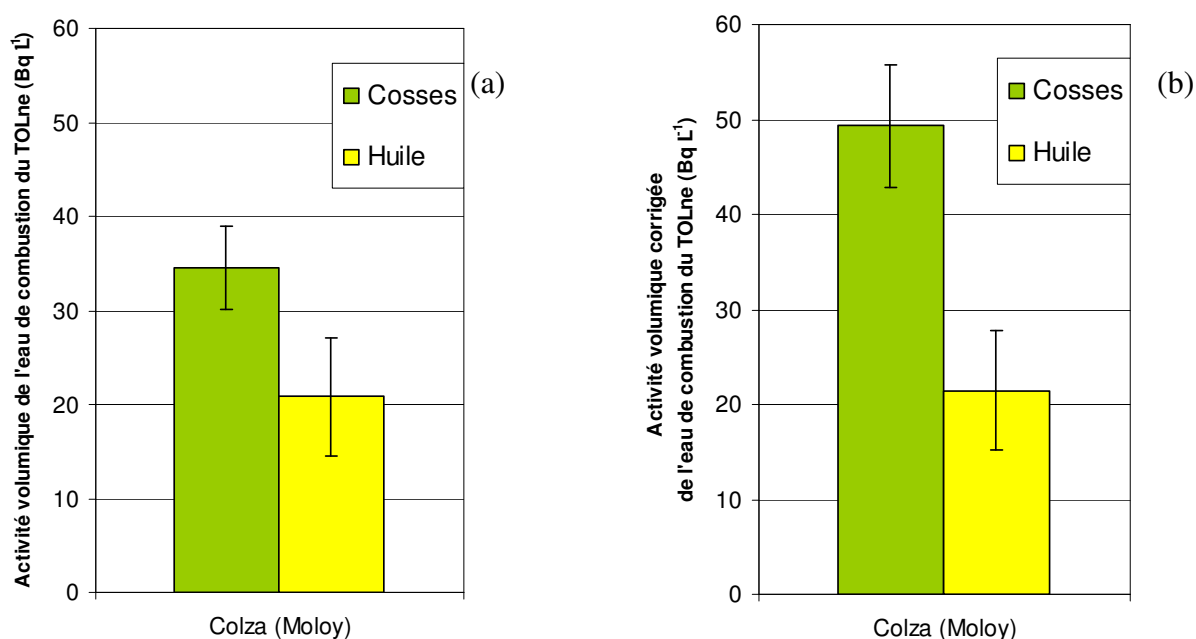


Figure 4-9 : Comparaison de l'activité volumique de l'eau de combustion de la matière sèche après rinçage isotopique (TOLne) des cosses et de l'huile de Colza prélevé à Moloy, corrigée (b) ou non (a), par la contribution de l'hydrogène non-échangeable à l'hydrogène total de la fraction considérée

Concernant les céréales, on observe que les activités mesurées sur l'eau de combustion du **TOLne** sont du même ordre de grandeur pour les 4 différentes fractions des prélèvements de Salives et Echalot, comme pour les deux fractions obtenues sur les échantillons de Léry. Sur ces 4 échantillons, l'activité volumique de l'eau de combustion du gluten est inférieure à celle de l'amidon de 10 à 20 %. Cette différence est compensée par la différence de contribution à

l'hydrogène total de la fraction échangeable (estimé à 28 % pour l'amidon et 40 % pour le gluten). Une fois la correction apportée, la différence observée entre les deux fractions varie de -7 % à +3 %.

En revanche, sur les deux échantillons de Moloy, les activités volumiques mesurées sur l'eau de combustion du gluten et de l'amidon diffèrent d'un facteur 4. Cette différence ne peut pas être expliquée par les incertitudes de mesure : même pour le prélèvement de juillet, où l'incertitude de mesure relative est importante, les domaines d'incertitudes de l'amidon et du gluten ne se chevauchent pas à  $k = 2$ . De plus, la différence observée reste du même ordre de grandeur qu'on applique ou non la correction liée à la dilution du **TOLne** lors de l'**échange labile**. Enfin, la différence d'un facteur 4 entre les activités volumiques des deux fractions étant observée sur le prélèvement de juillet (grains en cours de remplissage) et sur celui d'août (grains à pleine maturité), on comprend que cela ne peut pas être lié à la faible différence dans les périodes de remplissage du grain en amidon et en gluten : les protéines de réserves continuent à remplir le grain jusqu'à 5 jours après que l'amidon soit complètement formé, sur une durée de remplissage total d'environ 30 jours (Dupont et Altenbach, 2003).

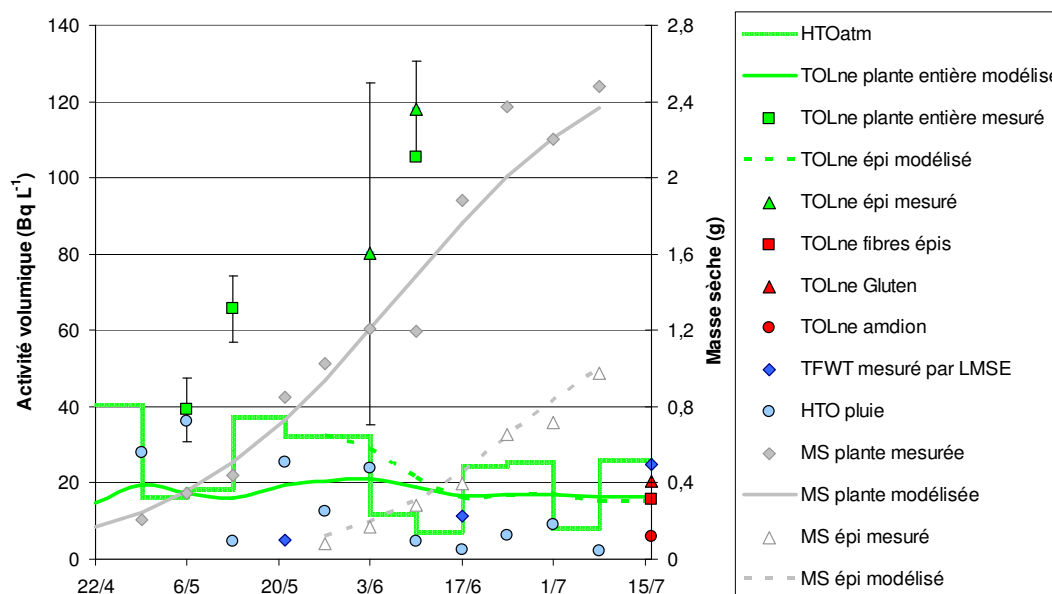
Sur le colza, l'eau de combustion des **cosses** présente une activité volumique 75 % supérieure à celle de l'huile extraite. Si on applique la correction de la « dilution isotopique » induite par l'**échange labile**, cette différence s'accroît puisque on peut estimer que dans les fibres qui composent les **cosses**, près de 30 % de l'hydrogène est échangeable alors que dans l'huile cette fraction en constitue moins de 5 %. On atteint donc, après correction, une différence de plus d'un facteur 2. Compte tenu de la stabilité de l'activité atmosphérique mesurée à Moloy (voir la **Figure 4-6 b**), cette différence ne peut pas être expliquée par la seule différence de période de synthèse des constituants respectifs des **cosses** et des réserves lipidiques des graines.

Ainsi, l'hypothèse la plus plausible sur l'origine des différences de rapport isotopique observées est que les voies métaboliques conduisant à la synthèse des différents composés étudiés soient le siège de fractionnements isotopiques différents. Nous n'avons cependant pas d'explication sur l'observation de ce phénomène sur le blé de Moloy et pas sur les autres céréales collectées.

## 2.3. Evolution du TOLne

Le **TOLne** a été mesuré sur plus de 40 échantillons. Pour les échantillons prélevés au début de la campagne de prélèvements (ceux du 6 mai et du 13 mai), l'échantillon brûlé est constitué de l'ensemble de la partie aérienne prélevée. Dès que l'**inflorescence** du blé et de l'orge a été suffisamment différenciée pour être séparée, elle (puis l'épi) était brûlée à part du reste de la partie aérienne de la plante (tige et feuille).

Les résultats obtenus lors de cette deuxième campagne de prélèvements semblent être entachés de biais évoluant avec l'avancée dans les campagnes de prélèvements. Compte tenu que ces échantillons n'ont pas été stockés dans les conditions identiques à celles des autres échantillons de l'étude, cela constitue l'hypothèse la plus probable quant à l'origine de ces biais. La **Figure 4-10**, comme exemple des résultats obtenus, illustre le phénomène observé sur au moins 3 des 6 séries de suivi (orge de Salives, blé de Moloy et orge de Léry) : une évolution progressive de l'activité volumique de l'eau de combustion de la matière sèche après **échange labile** vers une valeur supérieure à  $100 \text{ Bq L}^{-1}$ , sans rapport avec l'activité volumique de l'atmosphère au cours du suivi, ni avec aucune autre donnée à laquelle on peut la comparer (activité tritium de l'eau de pluie et activité de l'eau libre des végétaux prélevés mensuellement aux stations de mesures environnementales sur la **Figure 4-10** ou au tritium total sur la **Figure 4-6 b**).



**Figure 4-10 : Comparaison des valeurs de TOLne mesurées sur l'Orge prélevé à Moloy avec les valeurs modélisées en fonction de leur croissance et de l'activité volumique de la vapeur d'eau atmosphérique d'après (25)**



Pour mettre en évidence l'évolution du biais observé, les résultats ont été systématiquement comparés au modèle décrit par (23) et modifiés afin de prendre en compte l'intégration par période successive (25) :

$$A_{TOLne(n)} = d \times \frac{m_{(n-1)} \times A_{TOLne(n-1)} + A_{HTOatm(n)} \times (m_{(n)} - m_{(n-1)})}{m_{(n)}} \quad (25)$$

avec :

$A_{TOLne}$  : activité volumique de l'eau de combustion de la matière sèche de l'échantillon ayant subi préalablement un **rinçage isotopique** (Bq L<sup>-1</sup>)

(n) et (n-1) : périodes de croissance et d'exposition

d : facteur de correction de l'activité volumique de l'eau de combustion afin de tenir compte de la dilution isotopique au cours du **rinçage isotopique** de la matière sèche de l'échantillon

m : masse sèche de l'échantillon mesurée à la fin de la période considérée (g)

$A_{HTOatm}$  : activité volumique de la vapeur d'eau atmosphérique (Bq L<sup>-1</sup>)

Les écarts constatés entre les valeurs de **TOLne** mesurées avec toutes les autres activités volumiques disponibles pour chaque station, y compris avec les résultats présentés dans la section 2.2 de cette Partie, ainsi qu'avec les valeurs généralement obtenues dans la bibliographie (Boyer *et al.*, 2009b ; Guétat, 2013 ; IAEA, 2009) motivent le choix de ne pas exploiter ici l'ensemble des résultats obtenus.

Plusieurs conclusions peuvent être tirées des résultats obtenus au cours de nos mesures. D'abord, l'espèce végétale, lorsqu'il n'y a pas de différence dans le métabolisme **photosynthétique**, n'induit pas de variation sensible dans la tritiation de la matière sèche produite dans des conditions similaires, ni dans la relation de l'eau libre (et de la fraction échangeable de l'hydrogène de la matière sèche) avec l'eau de l'environnement (principalement l'eau atmosphérique dans le cas de notre étude). Les différentes fractions organiques séparées depuis les épis de différentes céréales présentent des rapports Tne/Hne proches, hormis sur un échantillon. Si l'hypothèse d'un biais de manipulation ne peut être écartée, compte tenu notamment du faible nombre de répétitions, il apparaît que la question mérite d'être traitée plus en détails. Enfin, les biais identifiés dans la section 2.3 et attribués à

la modification des conditions de stockage des échantillons pour l'ensemble de cette expérience, soulignent la rigueur nécessaire lors du stockage et du traitement d'échantillons pour garantir la pertinence des mesures de leur activité tritium, comme cela a été démontré dans la Partie 3.1.





## **Partie 5. Le marquage du lait par le tritium**

Le lait présente plusieurs avantages pour une étude environnementale. Tout d'abord, il a une part importante dans notre alimentation, quelle que soit la forme sous laquelle il est consommé (lait à boire, yaourt, fromage, etc.). Ensuite, il permet de faire des prélèvements sur une matrice représentative de l'ensemble des grands groupes de molécules constitutives de l'organisme des vaches (protéines, sucres, **matière grasse**, minéraux et eau), qui plus est, sous une forme qui permet de séparer assez facilement les principales fractions qui nous intéressent dans l'étude du tritium. Enfin, les vaches, pour leur alimentation, consomment une quantité importante de fourrage, intégrant quotidiennement la production de grandes surfaces cultivées, avec une alimentation qui, dans les pratiques actuelles d'élevage, permet un bon suivi de la ration consommée.

Dans cette partie, nous présenterons justement les pratiques d'élevage des 4 exploitations qui ont été suivies au cours de la thèse et qui nous permettront de comprendre les différences dans la tritiation que nous observons dans les différents laits prélevés. La synthèse de nos résultats et la compréhension du métabolisme d'une vache laitière permettent de mettre en relation les activités volumiques des aliments et des constituants du lait.

## **1. Conditions d'élevage**

La rencontre des 4 exploitants agricoles dont les cheptels ont été suivis au cours de la thèse a permis de connaître les différentes pratiques culturales susceptibles d'avoir une influence sur la tritiation du lait. Un questionnaire leur a été soumis afin de traiter l'ensemble des points identifiés. Les données présentées ici sont la synthèse des réponses obtenues.

### **1.1. Localisation des cheptels**

Dans chacune des exploitations suivies, les vaches laitières sont essentiellement maintenues à l'étable. La situation géographique est confondue avec celle du siège de l'exploitation. Les sorties de la stabulation sont limitées dans le temps (quelques heures par jour) et cantonnées aux parcelles de prairies jouxtant l'étable lorsqu'il y en a. Compte tenu de la très forte pression de pâturage supportée par ces parcelles, l'apport alimentaire qu'elles permettent est négligeable.

## 1.2. Abreuvement

L'eau destinée à l'abreuvement des cheptels suivis est soit tirée du réseau d'eau potable soit issue d'un captage commun avec celle de l'eau du réseau. Compte tenu de la masse d'eau présente dans les abreuvoirs et le renouvellement permanent de cette eau, les variations d'activité de l'eau après son tirage sont négligeables. Ainsi, les mesures opérées trimestriellement par le **LMSE** sur l'eau du robinet des villages voisins de Valduc permettent d'avoir des valeurs fiables et représentatives de l'eau consommée par les cheptels.

L'eau d'abreuvement de l'exploitation de Larçon est l'eau de consommation du village de Salives. Sinon, les autres cheptels sont abreuvés à l'eau de leur village.

L'évolution de l'activité volumique de l'eau de consommation des 4 villages est représentée sur la **Figure 5-1**. Globalement, on observe que l'activité volumique des eaux de consommation de Salives et Echalot se démarque de celle de Lamargelle et Moloy, inférieure à  $10 \text{ Bq L}^{-1}$ . L'évolution de l'activité volumique de chacune des eaux de consommation est à la diminution régulière (aux incertitudes près), hormis pour celle de Lamargelle dont les fluctuations sont proches du seuil de décision.

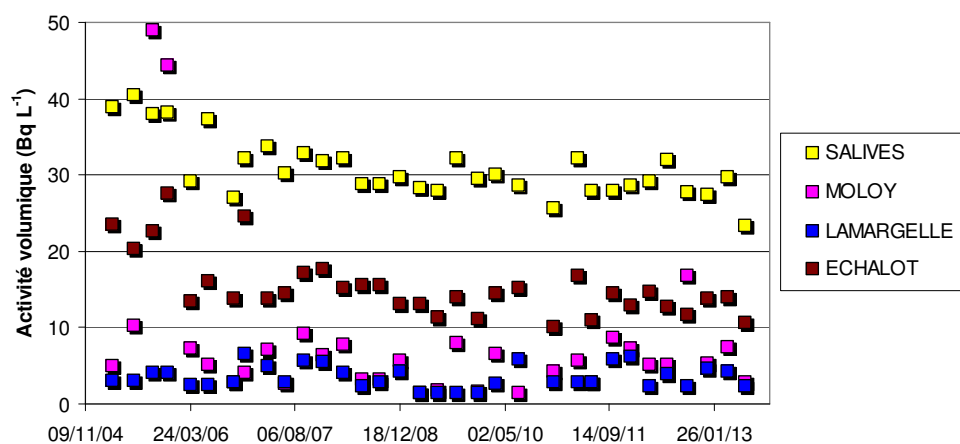


Figure 5-1 : Suivi de l'activité volumique des eaux de consommation de villages voisins de Valduc

## 1.3. Alimentation

Compte tenu de l'absence (ou de la quasi-absence) de pâturage pour les cheptels laitiers suivis, les aliments consommés à l'étable constituent l'intégralité de leur bol alimentaire,

facilitant ainsi le suivi de ce dernier au cours de l'étude. Durant celle-ci, à une exception près, les exploitants ont affirmé que la composition de l'alimentation de leur cheptel n'avait pas évolué, pas même de façon saisonnière. La seule modification qui a été signalée est l'ajout d'enrubannage dans la ration alimentaire de l'exploitation de Larçon début juin 2013.

La composition du bol alimentaire est assez variable entre les différents cheptels. Elle est représentée dans les **Figure 5-2** (en masse fraîche) et **Figure 5-3** (en masse sèche). La principale caractéristique commune aux quatre exploitations agricoles est la prédominance du **maïs d'ensilage** dans la composition de la ration : entre 52 % et 85 % de la masse fraîche (entre 30 % et 70 % de la masse sèche). Dans toutes les exploitations, le maïs donné aux cheptels provient de l'exploitation. Les autres aliments issus des cultures de l'exploitation sont essentiellement la luzerne (sous la forme de foin, d'**ensilage** ou de bouchon), de foin (issus de prairies fauchées) et de blé. Le reste de la ration est composé de différents aliments issus essentiellement de l'industrie agro-alimentaire dont certains sont spécifiquement produits pour l'alimentation animale (concentrés et autres granulés).

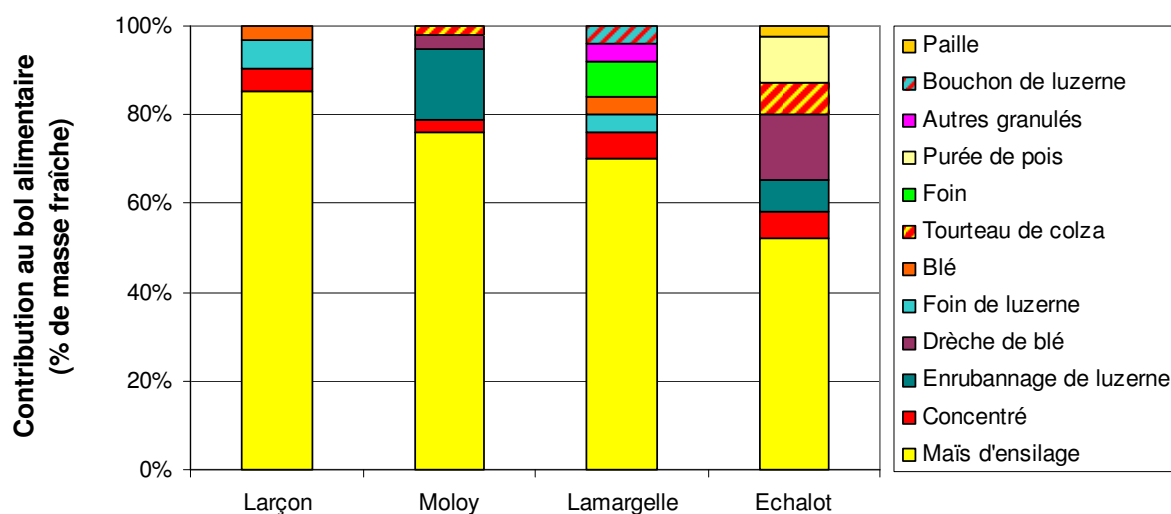


Figure 5-2 : Composition de la masse fraîche du bol alimentaire des cheptels laitiers suivis



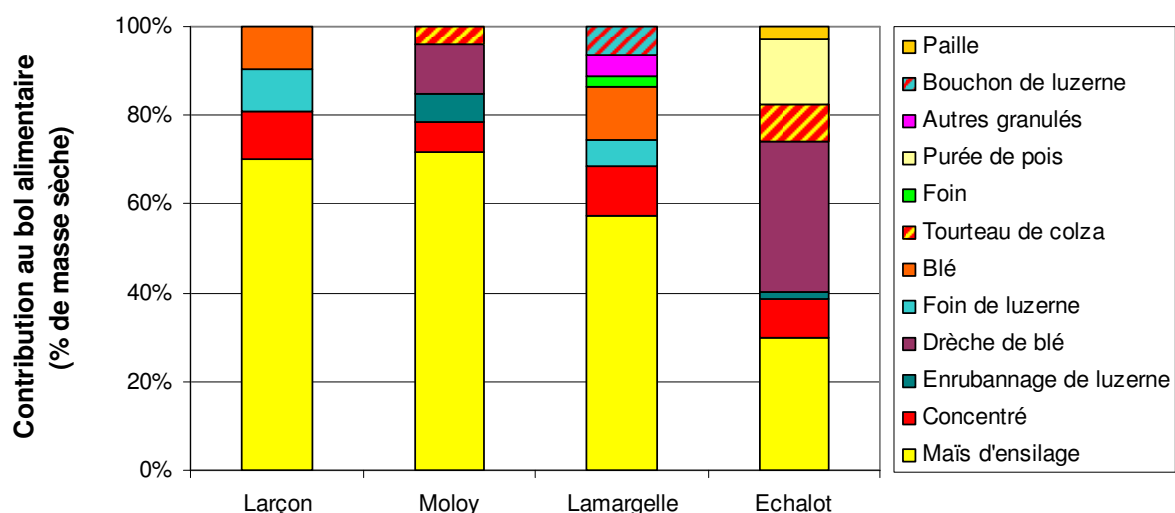


Figure 5-3 : Composition de la masse sèche du bol alimentaire des cheptels suivis

A partir de la bibliographie ou de la composition nutritionnelle des aliments (lorsqu'elle est disponible), l'apport de chacun des aliments en différents nutriments est évaluée. Nous avons ainsi déterminé les apports de chacun en fibres digestibles, autres glucides, protéines et lipides. La composition de la ration alimentaire de chacun des cheptels est ainsi représentée par la **Figure 5-4**. On remarque que, globalement, la composition nutritionnelle des rations alimentaires est homogène entre les cheptels.

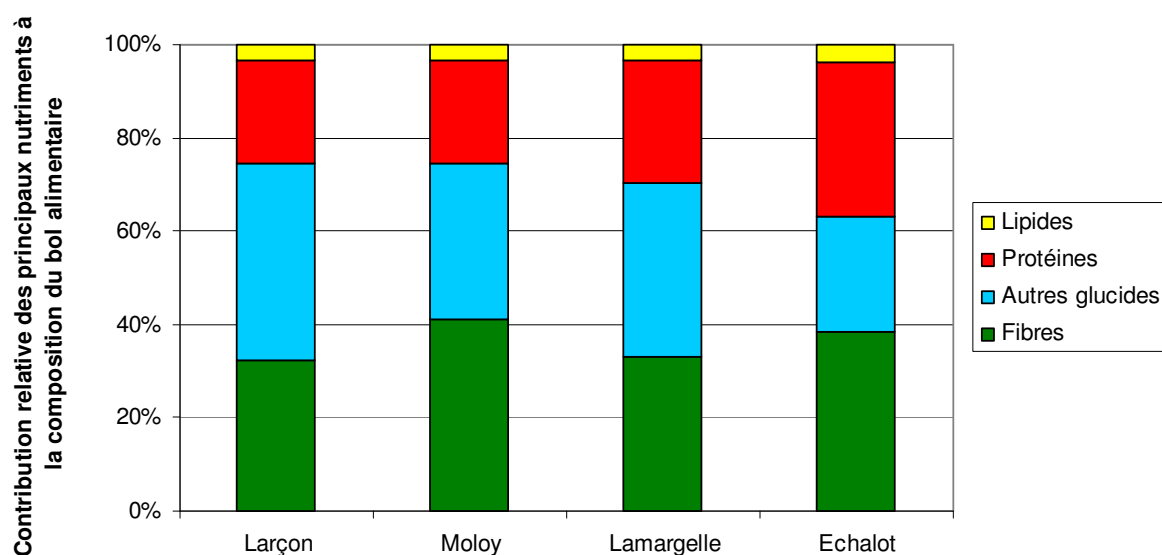
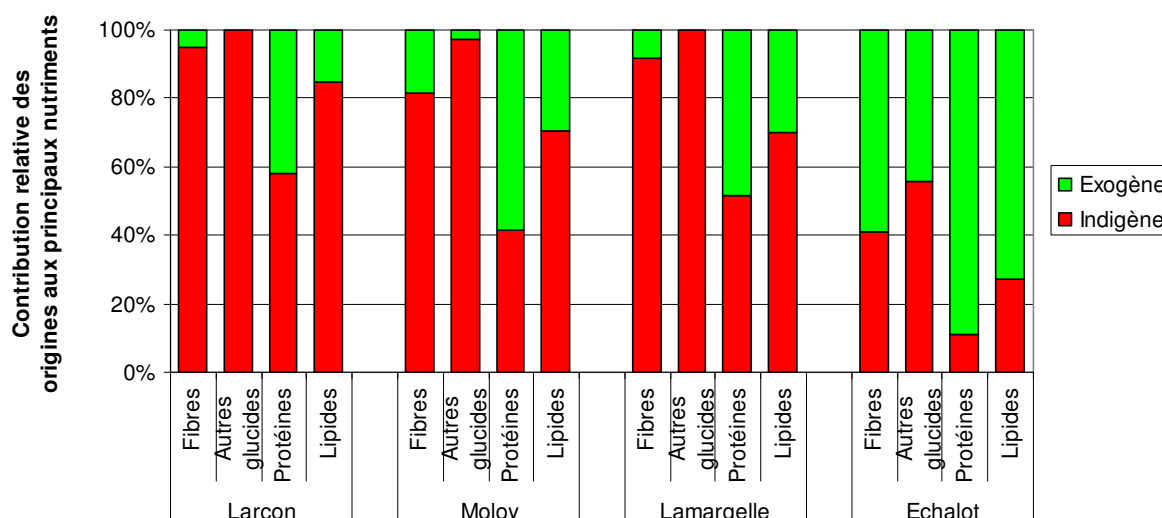


Figure 5-4 : Composition nutritionnelle des rations alimentaires des cheptels suivis

L'origine des aliments (et donc des nutriments) est importante pour l'étude puisqu'elle conditionne la tritiation ou non de l'hydrogène non-échangeable qui les constitue. Ainsi, la

**Figure 5-5** croise les données de l'origine des aliments avec leur composition nutritionnelle. On observe que 2 profils se distinguent nettement. Le premier (pour les cheptels de Larçon, Moloy et Lamargelle) est essentiellement d'origine locale. Seules les protéines ont une part importante qui provient de l'industrie agro-alimentaire (entre 40 % et 60 %). Les nutriments organiques qu'ingère le cheptel d'Echalot proviennent eux essentiellement de l'industrie. Seuls les fibres et autres glucides sont bien représentés dans la ration alimentaire. Les nutriments indigènes proviennent pour l'essentiel du **maïs d'ensilage** de l'exploitation.



**Figure 5-5 : Origine des nutriments organiques composants la ration alimentaire**

En 2011, l'ensemble des composants des rations alimentaires a été échantillonné le 22 juin afin de mesurer l'activité du **TOLne**. Comme attendu, seuls les aliments produits par les exploitations présentent une activité volumique de l'eau de combustion de leur matière sèche significative après **échange labile** significative. L'activité volumique de l'eau de combustion des autres aliments est très faible quand elle n'est pas inférieure au seuil de décision. Il est tout à fait vraisemblable que les activités mesurées au-dessus du seuil de décision soient dues à un marquage de l'échantillon au cours du stockage (sacs percés au cours du stockage dans le congélateur).

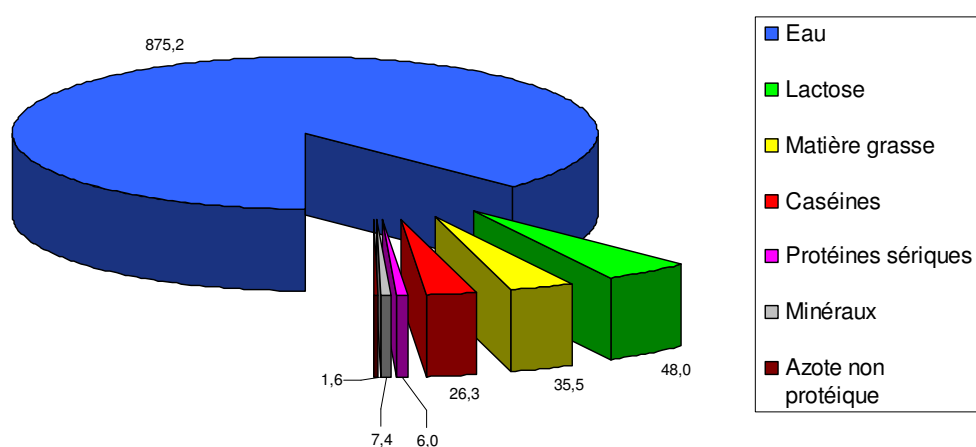
Un prélèvement de la ration alimentaire « prête à consommer » a été réalisé le 5 juin 2013 dans chacune des exploitations ainsi que plusieurs semaines dans l'exploitation de Larçon. Le **TOLne** a été mesuré dans chacun de ces échantillons.

## 2. Tritiation des constituants du lait

### 2.1. Composition du lait

Le lait est l'aliment initial de tout jeune mammifère. Sa composition permet de satisfaire l'ensemble des besoins nutritionnels du nouveau né jusqu'à son sevrage. L'eau en est donc le composé essentiel dans lequel des molécules organiques et minérales sont en solution ou en suspension. Sa composition varie en fonction des espèces voire des races.

Compte tenu de l'importance du lait de vache<sup>5</sup> dans l'alimentation humaine, que ce soit sous forme de lait à boire ou de produits transformés (yaourts, fromages, beurre, crème, etc.) sa composition est bien connue (**Figure 5-6**), bien que ses propriétés soient un domaine d'études toujours dynamique.



**Figure 5-6 : Composition massique (g) d'un kilogramme du lait de Larçon prélevé le 4 juin 2012**

#### 2.1.1. L'eau

L'eau représente environ 87 % de la masse du lait. Elle est d'abord le nutriment essentiel par excellence, indispensable à la vie. Dans le lait, elle assure également la fonction de solvant

<sup>5</sup> Afin d'alléger le texte, dans la suite du document le terme « lait » sera, sauf mention contraire, employé pour désigner le lait de vache (comme le prévoit le décret du 25 mars 1924).

des composés hydrosolubles (molécules et ions), de support pour les composés en suspension et permet l'hydratation de nombreux composés.

On peut distinguer 2 formes d'eau dans le lait en fonction de son activité (rapport entre la pression de vapeur d'eau de l'aliment sur la pression de vapeur saturante à la même température) :

- l'eau libre (environ 96 % de l'eau totale) : cette fraction a des propriétés physiques, chimiques, mécaniques et microbiologiques proches de celles de l'eau pure. Son activité (**A<sub>w</sub>** pour *Activity water*) est proche de 1. C'est donc la fraction liquide de l'eau qui est congelable et évaporable.
- l'eau liée (environ 4 % de l'eau totale) : cette fraction peut également être subdivisée en deux catégories à savoir l'eau faiblement liée et celle fortement liée. La première catégorie renvoie à des molécules d'eau qui sont sous la forme de couches polymoléculaires autour des molécules organiques ou minérales auxquelles elles sont liées par des liaisons faibles. Cette eau est congelable mais difficilement évaporable. L'eau fortement liée est la fraction qui se trouve sous forme monomoléculaire à la surface des molécules auxquelles elle est liée par des liaisons hydrogène ou au sein même de macromolécules, dans leur conformation tertiaire. L'**A<sub>w</sub>** de cette eau est compris entre 0,2 et 0,3. Elle n'est ni congelable ni évaporable.

Lors de la mesure de l'activité volumique en tritium d'une matrice, le **TFWT** intègre à la fois l'activité de l'eau libre et de l'eau liée (à condition bien sûr d'extraire toute l'eau de la matrice).

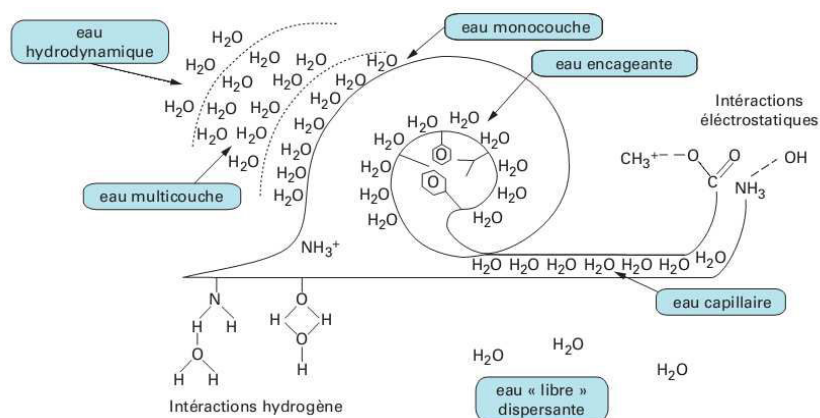


Figure 5-7 : Différents types d'interactions protéines/eau (in Snappe *et al.* 2010, d'après Cayot et Denis, 1998)

## 2.1.2. Les composés organiques

### 2.1.2.1 Le lactose

Le sucre principal du lait (et commun au lait de tous les mammifères) est le **lactose**, un disaccharide de **glucose** ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) et de  $\beta$ -galactose. Deux **isomères** coexistent donc dans le lait, en quantité égale : le **lactose** hydraté ( $\alpha$ -**lactose**) et le **lactose** anhydre ( $\beta$ -**lactose**). Sa solubilité dans l'eau est faible ( $0,216 \text{ g mL}^{-1}$  à  $20^\circ\text{C}$ ) comparée à celle du saccharose ( $2,019 \text{ g mL}^{-1}$  à  $20^\circ\text{C}$ ) ou du **glucose** ( $0,470 \text{ g mL}^{-1}$ ). Son pouvoir sucrant est assez faible : seulement 0,16, ce qui signifie que sa saveur sucrée est 16 % de celle du saccharose dont le pouvoir sucrant est 1.

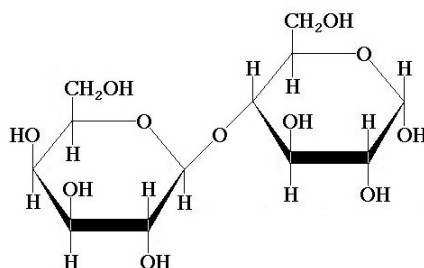


Figure 5-8 : Formule en perspective d'une molécule de lactose

### 2.1.2.2 La matière grasse

La **matière grasse** est composée de molécules caractérisées par leur insolubilité dans l'eau et leur masse volumique inférieure à celle de l'eau. On distingue trois types de substances composant la **matière grasse** du lait : les acides gras libres, les lipides et les matières grasses **insaponifiables**.

#### 2.1.2.2.1 Les acides gras libres

Les acides gras sont des acides organiques monocarboxyliques dont la chaîne carbonée **aliphatique** varie de 4 à 30 **atomes** de carbone. Ils sont composés d'une chaîne **hydrophobe** et d'un groupement acide. Ils sont saturés (toutes les liaisons carbone-carbone sont simples) ou insaturés (au moins une **liaison covalente** entre carbone est double). On peut donc caractériser les acides gras libres par la longueur de leur chaîne carbonée ainsi que par le nombre et la position des doubles liaisons entre **atomes** de carbone. Les acides gras libres constituent environ 0,15 % de la masse de la **matière grasse** du lait.

#### 2.1.2.2.2 Les lipides

Les lipides sont élaborés à partir d'acides gras qui constituent près de 90 % de leur masse. La plupart des lipides sont des esters, essentiellement représentés par les triglycérides (plus de 98 % de la **matière grasse**). La lipolyse (dégradation des lipides) libère des alcools et des acides gras. Cette réaction est très lente à température ambiante. Les lipides constituent près de 99,5 % de la masse de la **matière grasse** du lait. Le reste est composé de la **matière grasse** insaponifiable qui regroupe notamment des hydrocarbures (dont le carotène) et des alcools (dont le cholestérol, les vitamines E, A, D et K).

#### 2.1.2.2.3 Organisation dans le lait

Le lait est une émulsion de **matière grasse** dispersée sous forme de microgouttelettes de triglycérides entourés d'une membrane complexe dans un liquide qui présente des analogies avec le plasma sanguin (Boutonnier). On compte environ 1,5 à 4 milliards de microgouttelettes de **matière grasse** par millilitre de lait. Leur taille varie entre 0,1 et 20  $\mu\text{m}$  (près de 60 % de la **matière grasse** est sous forme de gouttelettes dont la taille est comprise entre 1 et 5  $\mu\text{m}$ ).

Chaque gouttelette est entourée d'une couche protectrice appelée membrane globulaire. Cette membrane permet la stabilité de l'émulsion en évitant la **coalescence** des microgouttelettes et la remontée de la **matière grasse** à la surface. Elle est essentiellement composée de protéines (environ 41 %), de phospholipides (27 %), de glycérides (14 %) et d'eau (13 %).

### 2.1.2.3 Les protéines laitières

#### 2.1.2.3.1 Les caséines

Les **caséines** représentent environ 80 % des protéines totales du lait. Elles sont des complexes organiques constitués de protéines sous forme d'une chaîne lâche et emmêlée qui fixe par des liaisons chimiques du phosphore et du calcium (**Figure 5-9**). Les **caséines** sont organisées en micelles, particules sphériques constituées également de quelques fragments **peptidiques** et de composés salins (calcium et phosphate). Les **caséines** ont un faible niveau d'organisation secondaire, essentiellement en **hélices  $\alpha$**  et en **feuilletés  $\beta$** . Elles précipitent à un pH de 4,6 (Snappe *et al.*).

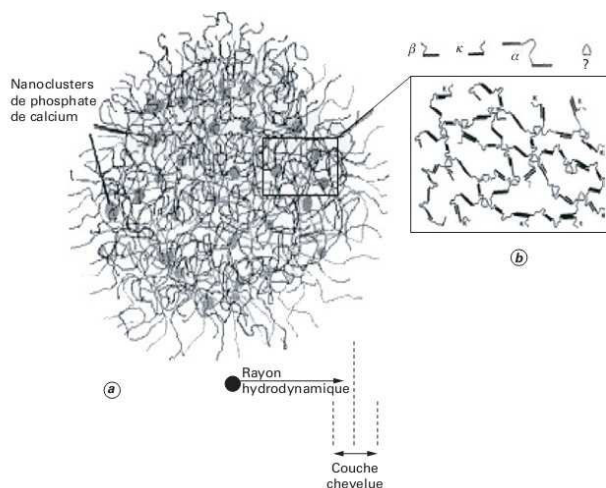


Figure 5-9 : Une micelle de caséine représentée selon le modèle « Structure ouverte » (in Snappe *et al.*)

Les **caséines** précipitent dans l'estomac et leurs **acides aminés** sont libérés lentement. Leur absorption est également lente. Elles sont riches en acide aspartique-asparagine, en **acide glutamique-glutamine** ainsi qu'en **proline**, **sérine** et **tyrosine**. Elles sont en revanche pauvres en **cystéine**.

#### 2.1.2.3.2 Les protéines solubles

Elles constituent les 20 % restants des protéines du lait. Elles sont également appelées **protéines sériques** car elles restent dans la phase aqueuse (le **sérum**) après précipitation des **caséines**. Elles sont sous la forme de chaîne enroulée en pelote très serrée. La  $\beta$ -lactoglobuline, l' $\alpha$ -lactalbumine, la sérumalbumine bovine, les immunoglobulines et la lactoferrine constituent près de 90 % des **protéines sériques** totales. Elles sont riches en **acides aminés** soufrés.

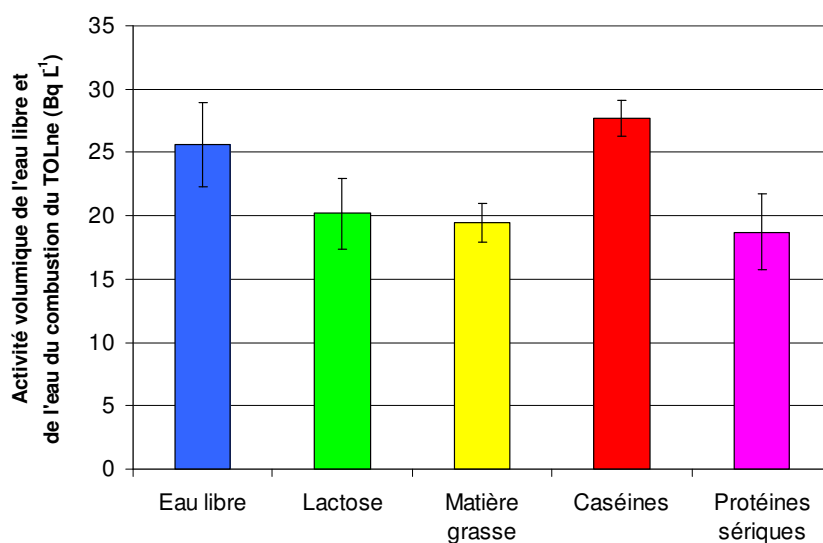
Les **protéines sériques** sont très digestibles et passent rapidement à l'intestin où leurs **acides aminés** sont absorbés. Elles sont riches en **acides aminés** essentiels ainsi qu'en **acides aminés** branchés et soufrés.

### 2.1.3. Les minéraux dans le lait

Le lait contient de 8,5 à 9 g de minéraux par litre de lait. Ils sont en solution vraie ou à l'état colloïdal. Le calcium (environ  $1,2 \text{ g L}^{-1}$  de lait) est associé pour 2/3 aux micelles de **caséines**. Le phosphore (environ  $1 \text{ g L}^{-1}$  de lait) est pour moitié colloïdal et pour moitié non-micellaire.

## 2.2. Répartition du tritium dans un lait

Un lait prélevé dans l'exploitation de Larçon le 4 juin 2012 a été traité selon le schéma technologique proposé par l'UMR STLO (**Figure 2-5**) afin de séparer ses principaux constituants organiques et de mesurer l'activité de leur **TOLne**. Les résultats bruts du **TOLne** des différentes fractions ainsi que celle de l'eau libre sont présentés **Figure 5-10**.



**Figure 5-10 : Activité volumique de l'eau libre et du TOLne des principales fractions organiques du lait de Larçon prélevé le 4 juin 2012**

Il est alors possible d'évaluer l'activité tritium du lait par unité de masse ainsi que la contribution de chacune des fractions à l'activité globale du lait frais. Ainsi, le lait de Larçon prélevé le 4 juin 2012 présente une activité massique en tritium de  $24,7 \text{ Bq kg}^{-1}$  de lait frais répartie entre les différents composants tel que présenté **Figure 5-11**. On observe que l'essentiel de l'activité tritium du lait provient de l'eau ( $22,4 \text{ Bq kg}^{-1}$  de lait frais). Concernant le **TOLne**, la **matière grasse** est le premier contributeur à l'activité tritium du lait, notamment, de sa richesse en hydrogène non-échangeable ( $0,78 \text{ Bq kg}^{-1}$  de lait frais en **TOLne**). Le **lactose** et les protéines (**caséines** + **protéines sériques**) ont des contributions équivalentes (de l'ordre de  $0,56 \text{ Bq L}^{-1}$  de lait frais en **TOLne**). Le **TOLe**, toutes molécules organiques confondues, représente près de  $0,45 \text{ Bq kg}^{-1}$  de lait frais.



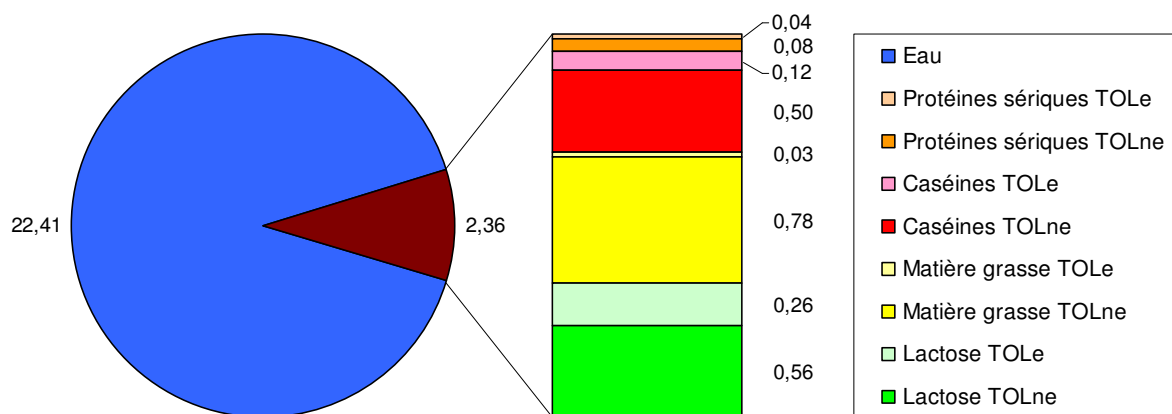


Figure 5-11 : Contribution des principaux composés hydrogénés à l'activité tritium du lait de Larçon prélevé le 4 juin 2012. Valeurs exprimées en  $\text{Bq kg}^{-1}$  de lait frais

La correction évoquée dans la Partie 3.3.3.2 est opérée afin de prendre en compte la dilution du **TOLne** par du **protium** en position échangeable lors de l'**échange labile**. On obtient ainsi la **Figure 5-12**.

On observe que l'activité volumique de l'eau de combustion corrigée, qui permet donc la comparaison des rapports isotopiques T/H quelle que soit la nature des matrices comparées, n'est pas homogène dans le lait. Ainsi, dans le cas du lait de Larçon étudié, les **caséines** présentent une plus grande teneur en tritium que les autres fractions du lait : à quantité d'hydrogène non-échangeable égale, il y a près de 2 fois plus de tritium en position non-échangeable dans les **caséines** que dans les lipides.

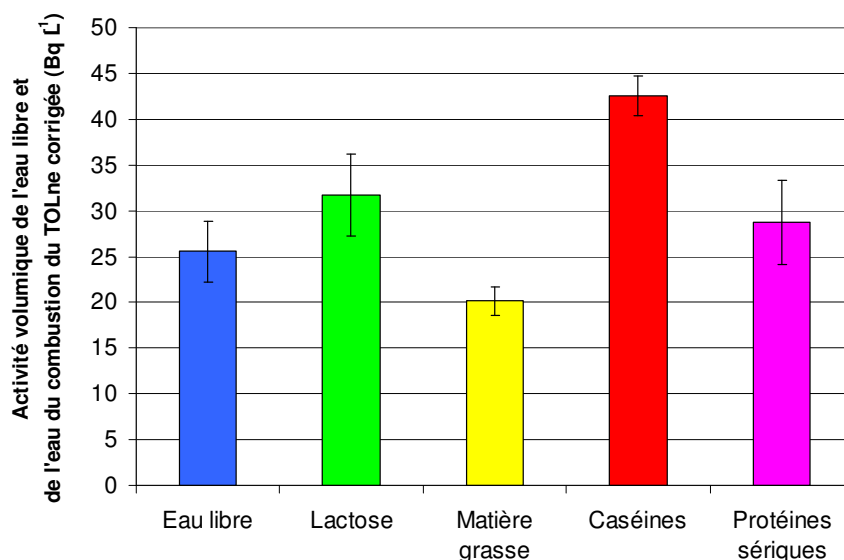


Figure 5-12 : Activité volumique de l'eau libre et activité volumique corrigée du TOLne des principales fractions organiques du lait de Larçon prélevé le 4 juin 2012

Pour Kirchmann *et al.* (1969) et Van den Hoek *et al.* (1985), les auteurs ont mesuré l'activité tritium des différents composés du lait tiré de vaches abreuvées avec de l'eau tritiée ou alimentées pendant 4 semaines avec du foin dont seule la fraction organique était marquée au tritium. Dans leurs expériences, ils ont également mesuré des différences significatives dans l'activité des principales fractions, bien qu'ils n'aient pas opéré la distinction entre TOLne et TOLt. Que les différences mesurées dans notre expérience et dans la leur ne soient pas identiques peut être expliqué par les conditions expérimentales, notamment que l'exposition des vaches étudiées dans Kirchmann *et al.* (1969) n'ait été seulement absorbée du tritium par leur eau d'abreuvement marquée alors que celles dans Van den Hoek *et al.* (1985) n'ont été exposées au tritium que par la fraction organique du foin.

**Tableau 5-1 : Demi-vies biologiques et importance relatives des différentes composantes du tritium dans les principaux constituants du lait à l'équilibre après (d'après Van den Hoek *et al.* 1985)**

	Demi-vie (en jours)			Importance relative des différents compartiments		
	1 <sup>ère</sup>	2 <sup>ème</sup>	3 <sup>ème</sup>	1 <sup>ère</sup>	2 <sup>ème</sup>	3 <sup>ème</sup>
Matière grasse	1,6	7,6	88,0	1,000	0,071	0,004
Caséines	1,5	10,2	82,0	0,280	0,073	0,014
Lactose	0,7	5,1	34,1	0,035	0,022	< 0,001
Eau du lait	-	5,0	67,7	-	0,052	< 0,001

Dans le cas d'une exposition uniquement par de l'eau tritiée, la fraction aqueuse du lait présente l'activité volumique la plus élevée. C'est le lactose qui présente l'activité volumique la plus élevée, bien que les différences mesurées soient généralement faibles. Dans les conditions du deuxième article, le TOLt de la matière grasse présentait la plus forte activité, suivie du TOLt des caséines (58 % de l'activité du TOLt de la matière grasse) et du TOLt du lactose (10 % de l'activité de la matière grasse). L'eau du lait présentait une activité tritium de 11 % de celle de l'eau de combustion du TOLt de la matière grasse. Cette expérience a également été poursuivie afin de mesurer la demi-vie du tritium dans chacun de ces compartiments après l'arrêt de l'exposition. Chaque demi-vie a pu être décrite par une fonction à 2 (l'eau du lait) voire 3 composantes (les autres composantes). Les résultats sont présentés dans le **Tableau 5-1**. L'activité tritium des protéines sériques n'a pas été mesurée,

les auteurs considérant, à la lumière de résultats obtenus dans d'autres expériences, qu'elle était similaire à celle des caséines. Nos résultats contredisent ce postulat.

Deux hypothèses peuvent être posées sur l'origine de ces différences :

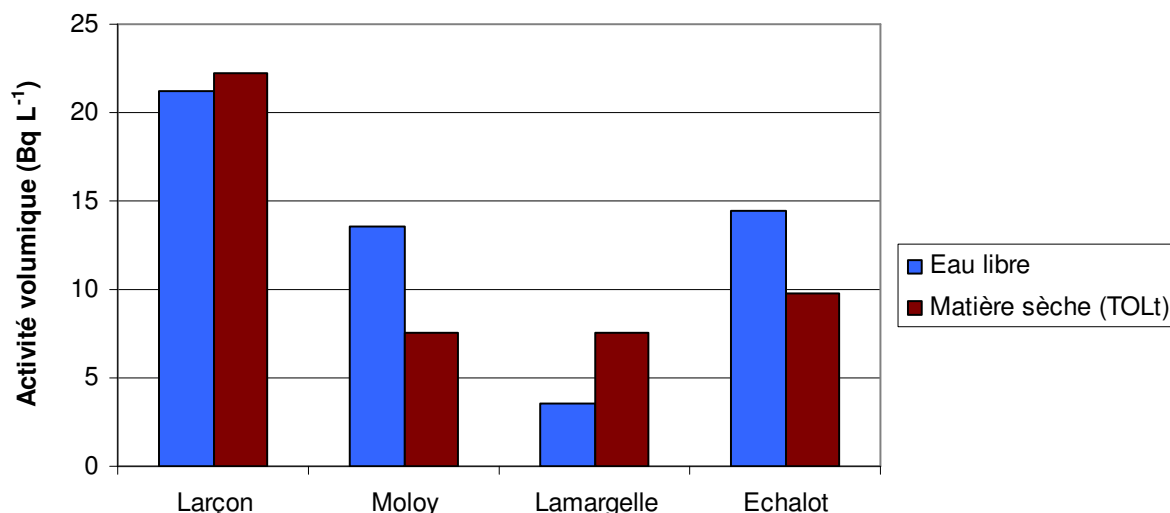
- les métabolismes conduisant à la synthèse des différents constituants organiques du lait induisent une modification (un appauvrissement ou un enrichissement) du rapport isotopique entre les compartiments
- les nutriments participant aux métabolismes conduisant à ces molécules n'ont pas le même rapport T/H et induisent ces différences apparentes.

### 3. Comparaison entre les laits des 4 exploitations

Afin d'étudier les mécanismes en jeu dans les différences de tritiation observées dans les différents constituants du lait de Larçon, les laits des 4 exploitations laitières voisines de Valduc sont comparés. Afin de limiter la logistique et compte tenu des faibles différences observées dans l'activité volumique (corrigée ou non) de l'eau de combustion du **lactose** et des **protéines sériques**, les laits comparés sont traités par des moyens plus rudimentaires qui permettent cependant de séparer les matières grasses, les **caséines** et le sérum (qui contient le **lactose** et les **protéines sériques**). Ainsi, le **lactose** et les **protéines sériques** seront réunis sous le terme de matière sèche du sérum acide (MS sérum acide dans les figures).

#### 3.1. Comparaison de l'eau libre et de la matière sèche

La **Figure 5-13** permet la comparaison globale de l'activité volumique de l'eau libre d'une part et de la matière sèche d'autre part des laits prélevés dans les 4 villages le 6 mai 2013.



**Figure 5-13 : Activité volumique de l'eau libre et de l'eau de combustion de la matière sèche des laits prélevés à Larçon, Moloy, Lamargelle et Echalot le 6 mai 2013**

On observe tout d'abord que les activités volumiques mesurées sont assez différentes entre les exploitations : près d'un facteur 6 entre les valeurs minimale et maximale mesurées sur l'eau libre des 4 laits prélevés le 6 mai 2013 et un facteur de 4,5 pour l'activité volumique de l'eau de combustion de leur matière sèche.

Il est également remarquable que les rapports entre les activités volumiques de l'eau libre et de l'eau de combustion de la matière sèche varient entre les exploitations : le rapport de l'activité de l'eau de combustion de la matière sèche sur celle de l'eau libre varie entre 0,56 (à Moloy) et 2,11 (à Lamargelle). On peut en déduire qu'il y a déconnexion, au moins partielle, entre l'activité tritium des deux compartiments.

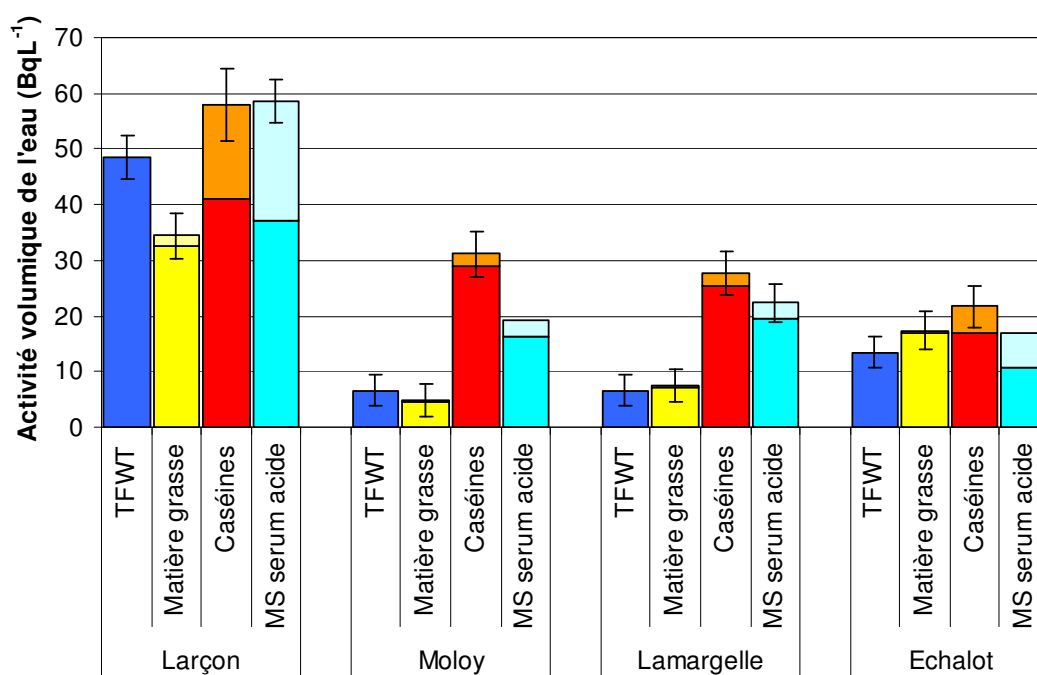
On peut en revanche se demander si les activités tritium des différentes fractions organiques sont corrélées.

### 3.2. Comparaison des fractions du lait

Le lait des 4 exploitations suivies a été prélevé simultanément, lors de deux campagnes : la première le 22 juin 2011 et la seconde le 6 mai 2013. L'objectif est de séparer les principales fractions organiques qui composent l'essentiel de la matière sèche de chaque lait et de

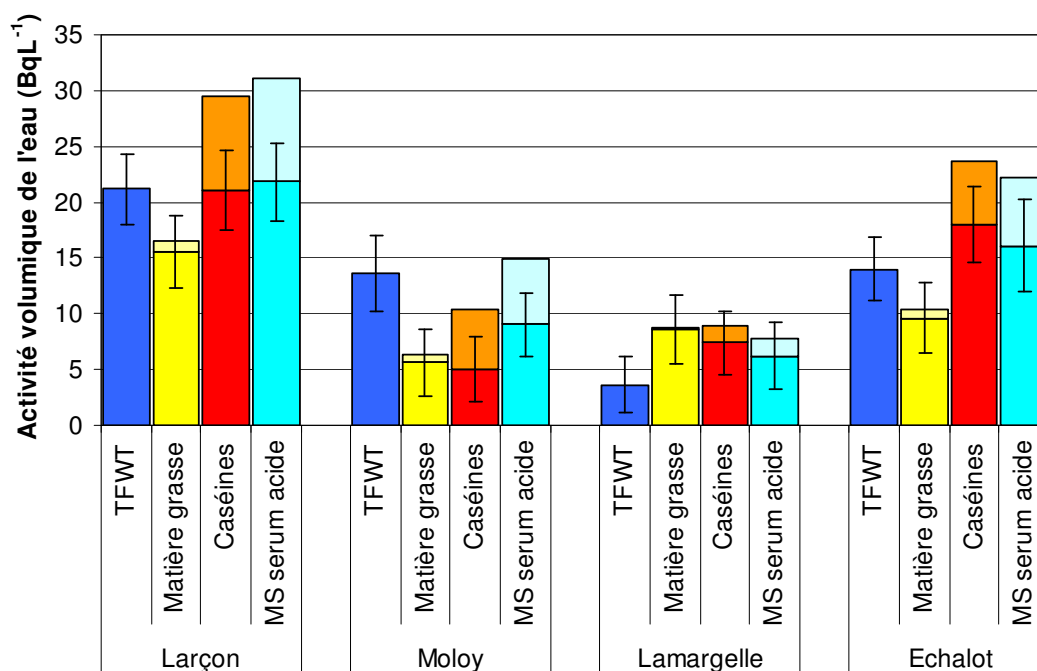
comparer les activités volumiques des eaux de combustion de ces fractions ainsi que celle de l'eau libre. Les résultats sont présentés respectivement dans les **Figure 5-14** et **Figure 5-15**.

On observe sur chacune des figures qu'il existe une disparité tant dans les activités volumiques des eaux (TFWT et eaux de combustion) pour chaque exploitation que dans les activités volumiques de chaque fraction au sein des exploitations. On remarque également que les profils d'activités volumiques sont différents entre le prélèvement de 2011 et celui de 2013.



**Figure 5-14 : Activité volumique de l'eau libre (TFWT) et de l'eau de combustion de la matière sèche (TOLT) des fractions organiques des 4 laits prélevés le 22 juin 2011.**

Le TOLT est mesuré et le TOLe (couleurs claires) est estimé à partir de l'activité volumique de l'eau libre, le TOLne (couleurs soutenues) est déduit par la relation  $TOLne = TOLT - TOLe$ , hormis pour la matière sèche du sérum acide pour laquelle le TOLne a été mesuré et le TOLe estimé.



**Figure 5-15 : Activité volumique de l'eau libre (TFWT) et de l'eau de combustion de la matière sèche des fractions organiques des 4 laits prélevés le 5 juin 2013.**

Le TOLne (couleurs soutenues) est mesurée et le TOLe (couleurs claires) est estimé à partir de l'activité volumique de l'eau libre. La somme des deux représente le TOLt.

On peut ainsi observer que les activités volumiques sont beaucoup plus dispersées lors de la campagne de 2011 que dans celles de 2013 : dans le premier cas, il y a par exemple près d'un rapport 10 entre l'activité volumique de l'eau de combustion de **matière grasse** la plus faible et celle la plus élevée en 2011, contre à peine plus d'un rapport 3 dans celle de 2013. De même, alors que dans les échantillons en 2010 on pouvait observer jusqu'à un rapport 10 entre l'activité volumique de l'eau de combustion de la **matière grasse** et les **caséines** du lait d'un même village, la différence la plus importante au sein d'un même lait en 2013 n'atteint pas un facteur 2.

Afin de pouvoir comparer les rapports isotopiques T/H dans les fractions non-échangeables de l'hydrogène, il est nécessaire d'opérer la correction décrite dans la Partie 3.3.3.2. Les résultats obtenus pour les 8 laits prélevés au cours des 2 campagnes de prélèvements sont présentés dans les **Figure 5-16** et **Figure 5-17**.

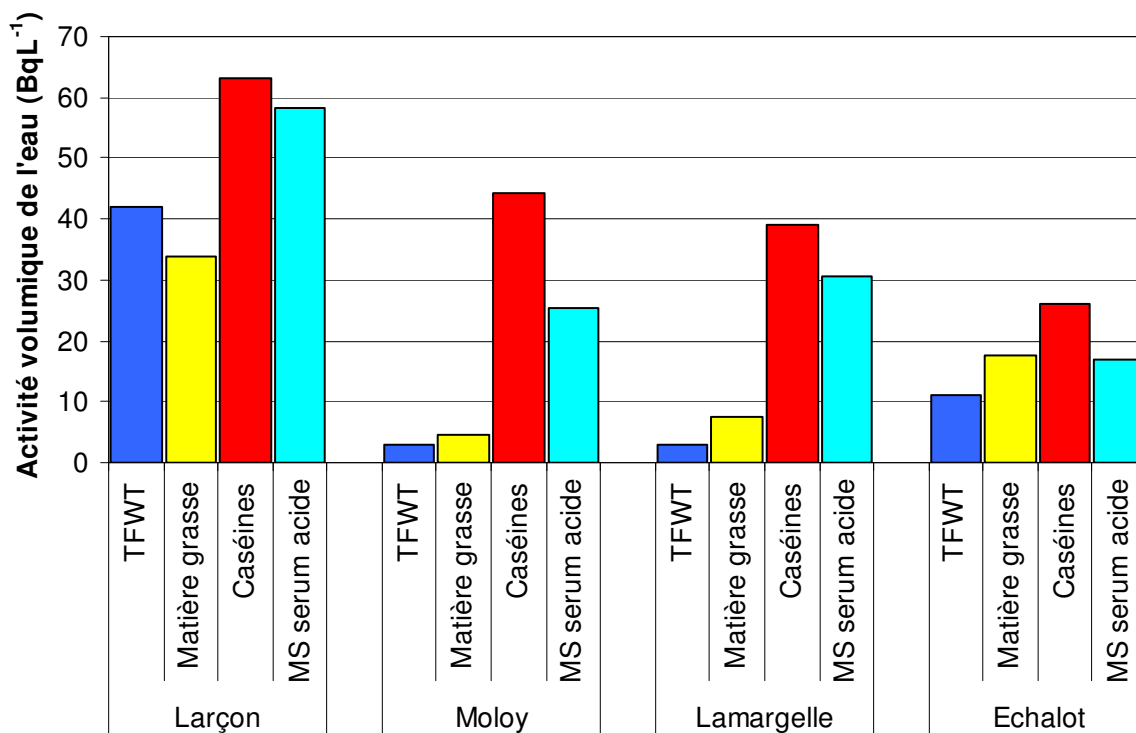


Figure 5-16 : Activité volumique de l'eau libre (TFWT) et du TOLne corrigée par la contribution relative de l'hydrogène non-échangeable à l'hydrogène total pour les principales fractions organiques des 4 laits prélevés le 22 juin 2011.

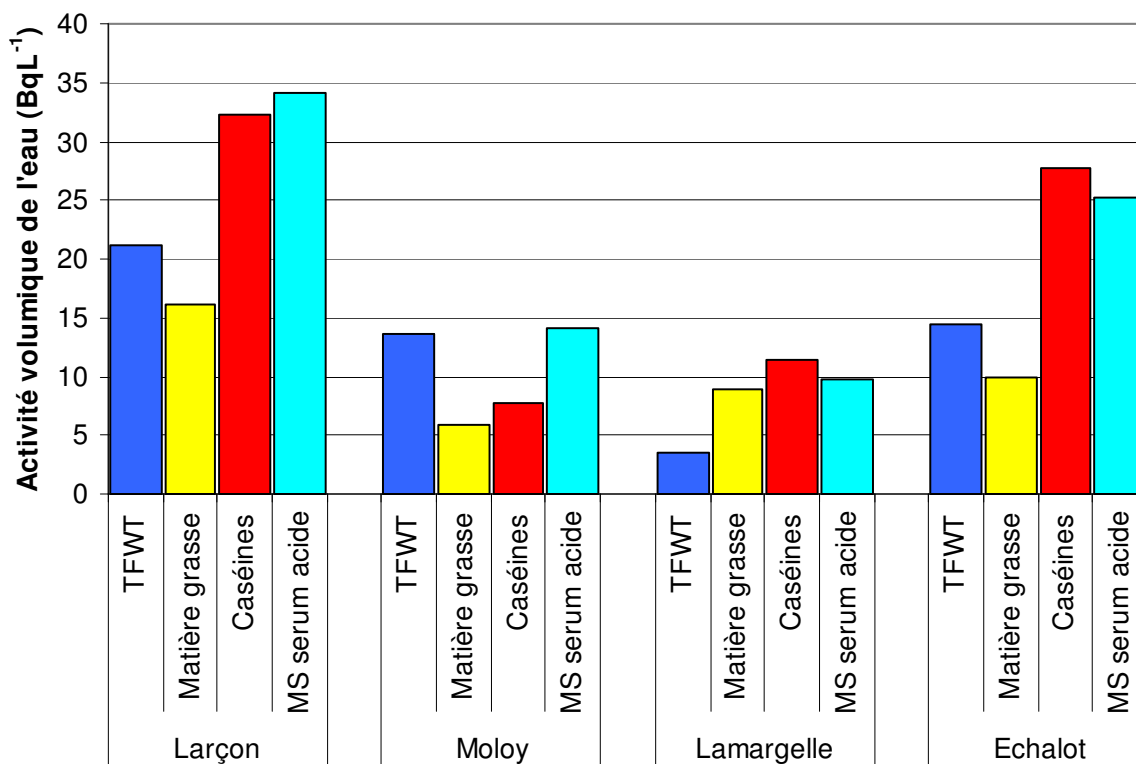


Figure 5-17 : Activité volumique de l'eau libre (TFWT) et du TOLne corrigée par la contribution relative de l'hydrogène non-échangeable à l'hydrogène total pour les principales fractions organiques des 4 laits prélevés le 6 mai 2013

Outre les hétérogénéités observées sur les activités volumiques des eaux de combustion entre échantillons et entre campagnes de prélèvements, on remarque que le rapport Tne/Hne<sup>6</sup> des **caséines** est systématiquement supérieur à celui de la **matière grasse** d'un même échantillon. Cette différence varie cependant de + 27 % à un facteur 10. Il n'apparaît aucune corrélation évidente entre ces deux fractions. On observe en revanche sur ces prélèvements une bonne corrélation entre le rapport Tne/Hne de la **matière grasse** et l'activité volumique de l'eau libre du lait (Test de Spearman : p-value > 0,05).

Les **caséines** et la matière sèche du sérum acide présentent des rapports Tne/Hne également bien corrélés (Test de Spearman : p-value > 0,05).

Trois voies d'**exposition** au tritium concernent les cheptels suivis : l'air ambiant (avec du HTO et du HT), leur eau d'abreuvement et la partie de leur alimentation qui est produite par l'exploitation (qui contient de l'HTO, du **TOLne** et du **TOLe**). L'eau d'abreuvement et l'alimentation des 4 exploitations ont été suivies afin de chercher les origines des différences observées entre exploitations et entre campagnes de prélèvements.

### 3.3. Eau d'abreuvement et alimentation

#### 3.3.1. Influence de l'eau libre

Les cheptels des 4 exploitations suivies sont abreuvés soit avec l'eau de consommation des villages, soit d'une eau qui a la même origine que l'eau de consommation du village voisin. Les eaux de consommation des villages autour de Valduc sont suivies trimestriellement par le **LMSE**. Les valeurs mesurées au cours de ces prélèvements de routine sont donc considérées dans notre comparaison, sauf mention contraire.

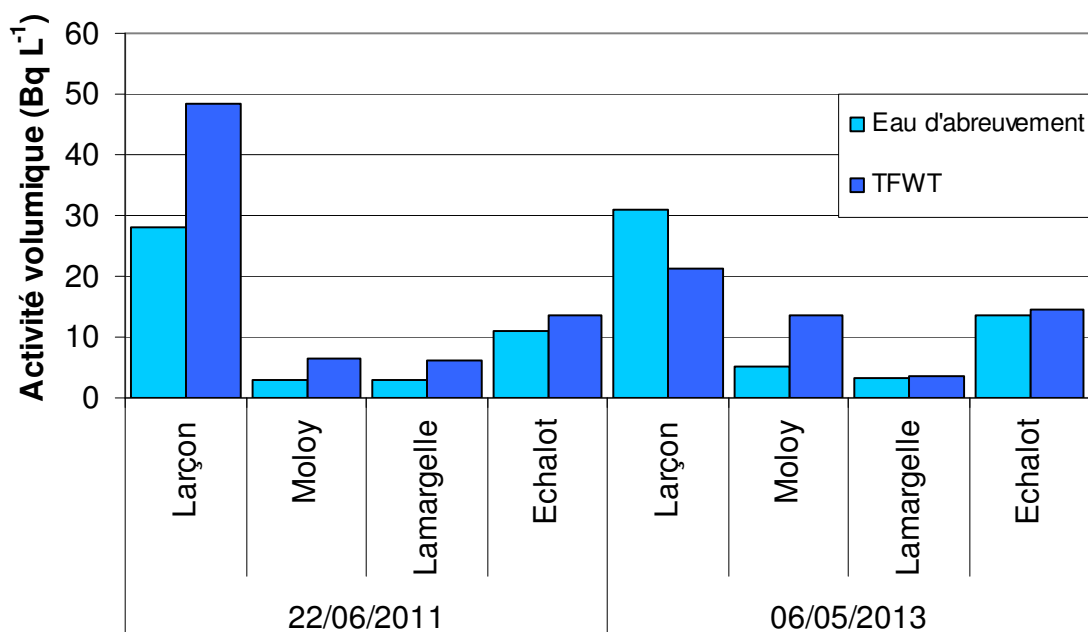
Comme cela apparaît sur la **Figure 5-18**, l'eau de consommation et l'eau libre des laits étudiés sont corrélées (test de Spearman : p-value < 0,05). On note cependant des différences

---

<sup>6</sup> Le rapport Tne/Hne est mesuré ici à partir de l'activité volumique de l'eau de combustion de la matière sèche après rinçage isotopique, corrigée par la contribution de l'hydrogène non-échangeable à l'hydrogène total de la matrice considérée (voir la Partie 3.3.3.2 pour plus de détails).



entre les deux eaux qui peuvent atteindre un facteur 2. Plusieurs éléments peuvent expliquer ces écarts.



**Figure 5-18 : Comparaison des activités volumiques de l'eau des villages et des TFWT des laits collectés au cours des deux campagnes de prélèvements**

Tout d'abord, si l'eau d'abreuvement est tirée du même réseau que l'eau de consommation des villages, elle est à disposition des cheptels dans des abreuvoirs où elle reste alors en contact de l'air et se renouvelle au fur et à mesure de sa consommation. Une variation de l'activité volumique en fonction de celle de la vapeur de l'eau de l'air est donc permanente.

Ensuite, l'activité volumique de l'eau des villages n'est pas constante dans le temps (voir **Figure 5-1**) et la **demi-vie** biologique de l'eau d'une vache allaitante est de 3,3 à 5 jours (IAEA, 1981 ; Van den Hoek, 1986). Une mise à l'équilibre complète nécessitant environ 5 périodes, l'eau libre du lait intègre donc les activités volumiques des eaux bues dans les jours qui précèdent le prélèvement.

Enfin, l'eau d'abreuvement d'une vache de 600 kg nourrie à l'**ensilage** de maïs ne couvre que 67 % des besoins en eau de l'animal. L'eau métabolique (5 %) et l'eau contenue dans l'alimentation (28 %) contribuent donc au 1/3 des apports (Khelil-Arfa *et al.*, 2012). Ces deux fractions sont donc susceptibles d'influer sensiblement sur l'activité volumique de l'eau libre

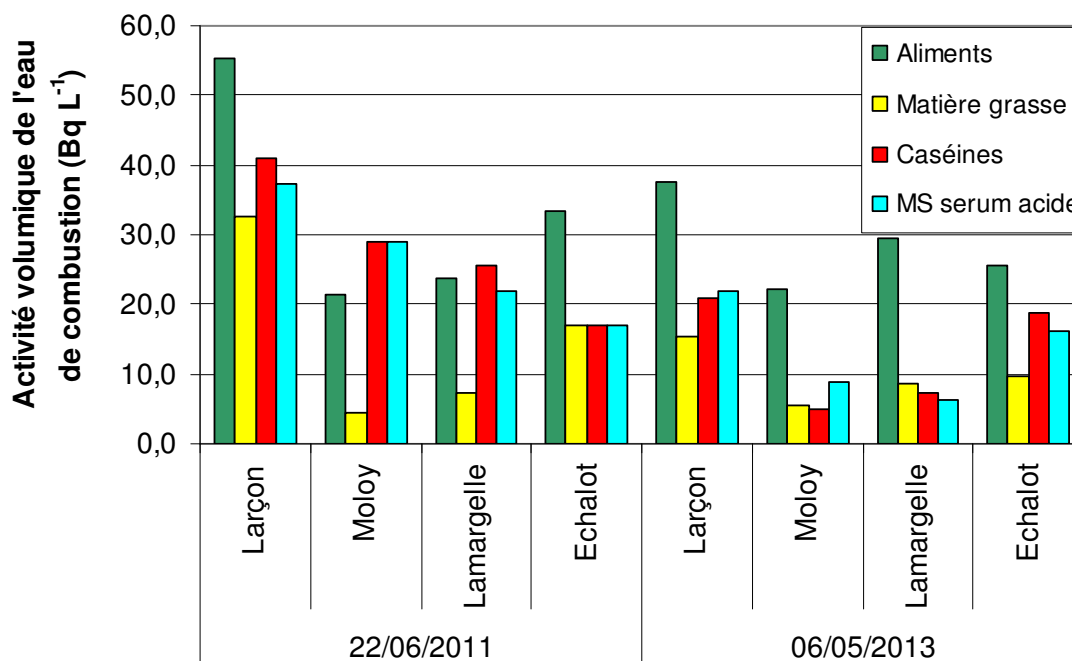
du lait de cheptels exposés chroniquement à de l'eau de consommation et à une nourriture produite dans des conditions d'exposition similaires. Il est d'ailleurs remarquable que le cheptel d'Echalot, dont l'alimentation est globalement plus riche en concentrés et sous-produits agro-alimentaires (qui contiennent moins d'eau que le **maïs d'ensilage** – voir section 1.3 de cette partie), est celui dont l'eau libre du lait a l'activité la plus proche de celle de son eau d'abreuvement, qui couvre une part plus importante de ses besoins en eau.

Compte tenu de la corrélation entre les activités volumiques de l'eau d'abreuvement et l'eau libre et la faible corrélation entre celles de l'eau libre et de l'eau de combustion des fractions organiques, l'influence de l'eau d'abreuvement sur la tritiation de la matière sèche en position non-échangeable n'est donc pas sensible dans les conditions d'**exposition** chronique des cheptels suivis, hormis pour la **matière grasse** (test de Spearman : p-value < 0,05).

### 3.3.2. Influence du TOLne de l'alimentation

#### 3.3.2.1 Activité tritium du bol alimentaire

Les aliments donnés aux cheptels ont été collectés lors des deux campagnes de prélèvements. L'échantillon a été prélevé directement dans la mangeoire, dans la ration que les cheptels étaient en train de consommer. Dans les échantillons collectés, il n'y avait pas de granulés (concentrés, **tourteaux** ou autres aliments industriels) qui sont soit donnés avec une autre ration alimentaire que celle du matin, soit distribués à la demande. Il faut tenir compte que l'activité mesurée dans la ration « prête à être consommée » (**Figure 5-19**) est donc principalement (si ce n'est exclusivement) celle des aliments produits par l'exploitation (essentiellement **maïs ensilé**, foin, **enrubannage** et paille).

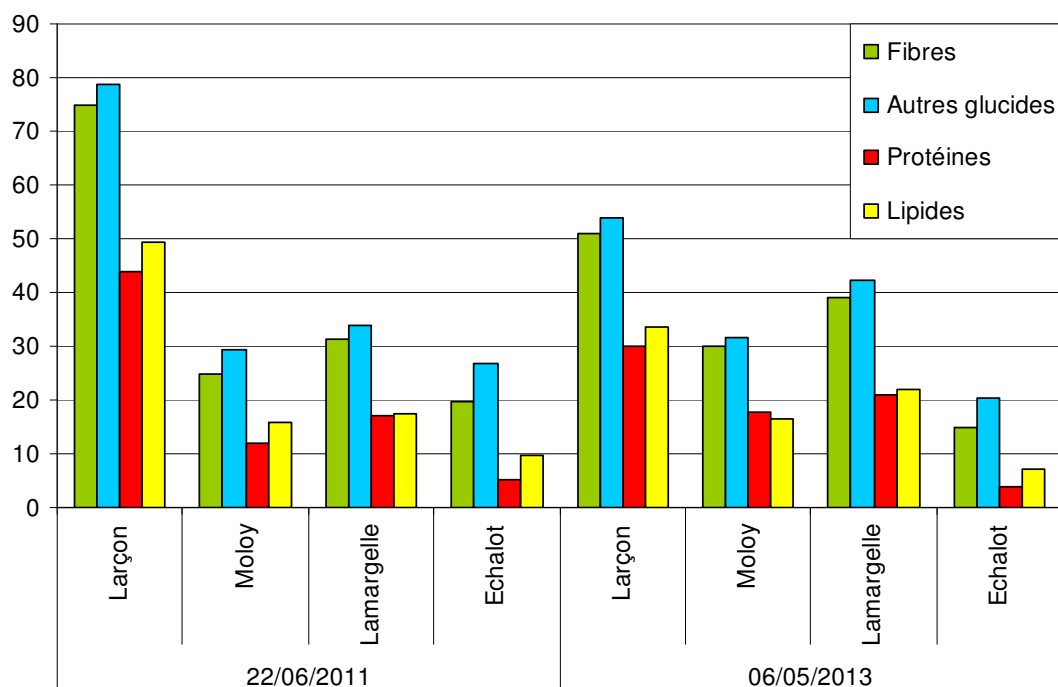


**Figure 5-19 : Activité volumique de l'eau de combustion de la matière sèche des aliments des cheptels suivis après rinçage labile comparée à celle des principales fractions organiques des laits collectés**

En l'état, aucune corrélation n'apparaît entre les activités volumiques de l'eau de combustion du **TOLne** des aliments et les différentes fractions organiques des laits échantillonnés. Deux corrections peuvent être apportées à ces résultats bruts :

- la correction de la dilution isotopique (pour les aliments et les fractions organiques)
- la correction liée à la présence de nutriments exogènes dans la ration alimentaire complète.

Pour apporter cette deuxième correction, on estime d'abord que l'activité en **TOLne** de la part de l'alimentation produite par l'exploitation est homogènement répartie entre les différents nutriments qui la composent. D'après les résultats exposés dans la Partie 4, ce postulat n'est pas idéal mais, à défaut de mesure fraction par fraction, il semble être le plus pertinent. Ensuite, l'activité volumique de chacune des fractions est corrigée par la dilution due à la part de nutriments qui est d'origine exogène dans le bol alimentaire complet. On obtient alors la **Figure 5-20**.



**Figure 5-20 : Activité volumique corrigée des différents nutriments composant le bol alimentaire**

Ces transformations, si elles sont nécessaires pour mieux rendre compte de la réalité du rapport Tne/Hne dans les différents nutriments qui composent le bol alimentaire complet, ne permettent toujours pas de mettre en évidence des corrélations entre les composants du bol alimentaire et ceux du lait. Cette absence de corrélation est notamment expliquée par le métabolisme de la digestion et de la synthèse des composants du lait chez la vache laitière.

### 3.3.2.2 Digestion des vaches laitières et biosynthèse du lait

#### 3.3.2.2.1 Digestion des hydrates de carbones

Les fibres végétales sont digérées dans le **rumen** des vaches par des microorganismes. Les produits finaux de cette digestion sont des **acides gras volatiles (AGV)** principalement constitués (95 %) par l'acide acétique, l'acide propionique et l'acide butyrique. Ces acides sont utilisés pour la synthèse du **lactose**, des protéines et de la **matière grasse** du lait. Près de 70 % du butyrate est transformé dans la paroi du rumen en  $\beta$ -hydroxybutyrate, un corps cétonique utilisé comme source d'énergie dans de nombreux tissus de la vache. Les corps cétoniques proviennent essentiellement du butyrate produit dans le rumen, hormis en début de

lactation (ou en situation de sous-alimentation), où ils proviennent également de la mobilisation des réserves lipidiques. Tous les sucres sont fermentés dans le rumen, il n'y a donc pas (ou très peu) de **glucose** absorbé au niveau intestinal. Dans le rumen, le **glucose** peut être converti en glycérol, véritable squelette de la **matière grasse** du lait. L'acétate et le  $\beta$ -hydroxybutyrate sont utilisés pour la synthèse des acides gras qui seront connectés au glycérol. L'énergie nécessaire à ces synthèses provient essentiellement des **corps cétoniques** et, dans une moindre mesure, du **glucose** et de l'acétate.

#### *3.3.2.2.2 Digestion des lipides*

La part de lipides dans les rations alimentaires est généralement faible, comme dans les rations alimentaires des cheptels suivis au cours de cette étude. Ils sont cependant importants et peuvent contribuer directement à 50 % de la **matière grasse** du lait. Ils sont d'abord hydrolysés (rupture de la liaison entre le glycérol et les acides gras) et saturés (remplacement des doubles liaisons carbone- carbone par adjonction d'hydrogène) dans le rumen. Le glycérol est rapidement fermenté en AGV. Les lipides qui quittent le rumen sont très majoritairement (85 à 90 %) des acides gras saturés (**acides palmitiques** et **stéariques**) attachés aux particules microbiennes ainsi que des **phospholipides** (10 à 15 %). Les phospholipides microbiens sont digérés dans l'intestin grêle et absorbés avec d'autres acides gras à travers la paroi intestinale. Les lipides sont mélangés à la bile et au jus pancréatique, formant ainsi des particules **miscibles** dans l'eau (des micelles), forme nécessaire à leur absorption à travers la paroi intestinale. Dans les cellules intestinales, les acides gras sont unis à du glycérol (provenant du sang) pour former des triglycérides. Ces triglycérides, certains acides gras libres, le cholestérol et d'autres substances lipidiques sont couverts d'une protéine pour former les lipoprotéines riches en triglycérides (LP-TG) aussi appelées cyclomicrons ou lipoprotéines de très faible densité. Les LP-TG sont absorbés dans les **vaisseaux lymphatiques**. Environ la moitié des acides gras de la **matière grasse** provient des LP-TG formés durant l'absorption intestinale des lipides.

#### *3.3.2.2.3 Digestion des protéines*

Les protéines ingérées sont d'abord dégradées en **acides aminés** puis en ammoniac et acides gras branchés. L'azote non protéique et l'urée recyclée dans le rumen contribuent également à la formation d'ammoniaque. Celui-ci est utilisé par la population bactérienne du rumen pour la synthèse de ses protéines. En moyenne, 20 g de protéines bactériennes sont synthétisées

pour 100 g de matière organique fermentée dans le rumen. La quantité de protéine bactérienne produite par jour varie entre 400 g et 1500 g en fonction de la digestibilité de la ration. On estime que 60 à 80% des protéines des fourrages sont dégradées dans le rumen alors que c'est seulement 20 à 60 % pour les concentrés et les sous-produits industriels. Le reste passe non-dégradé dans l'intestin grêle. Dans l'intestin grêle, l'acide sécrété par la caillette arrête l'activité microbienne et les enzymes digèrent les protéines bactériennes ainsi que les protéines alimentaires non-dégradées. En général, 80 % des protéines qui arrivent dans l'intestin y sont digérées. En moyenne, 60 % des **acides aminés** absorbés dans l'intestin proviennent des bactéries qui ont crû dans le rumen et les 40 % restant sont les protéines alimentaires qui ont résisté à la dégradation. Pendant la lactation, la glande mammaire a un grand besoin en **acides aminés**. Le métabolisme des **acides aminés** y est extrêmement complexe. La majeure partie des **acides aminés** absorbés par la glande mammaire sont utilisés pour la synthèse des protéines du lait.

Ainsi, l'essentiel de la matière organique ingérée est métabolisée par les bactéries du rumen. De nombreuses liaisons C-H sont rompues et autant sont créées dans cet organe par la flore bactérienne pour arriver à des molécules élémentaires qui n'ont plus que 2 à 4 **atomes** de carbone (les principaux AGV). Le devenir des nutriments ingérés est en cela très différent de celui des nutriments chez les **mammifères monogastriques**. Concernant les ruminants, et notamment les vaches, il semble donc plus pertinent de considérer le tritium dans sa globalité, de son absorption jusqu'à sa sécrétion dans le lait en passant par les différents métabolismes.

Compte tenu de ce constat, il semble intéressant de suivre une exploitation sur plusieurs semaines afin de mesurer la stabilité des différents facteurs considérés sur les 4 exploitations suite aux deux campagnes de prélèvement. Le choix se porte sur celle de Larçon.

## 4. Suivi d'une exploitation

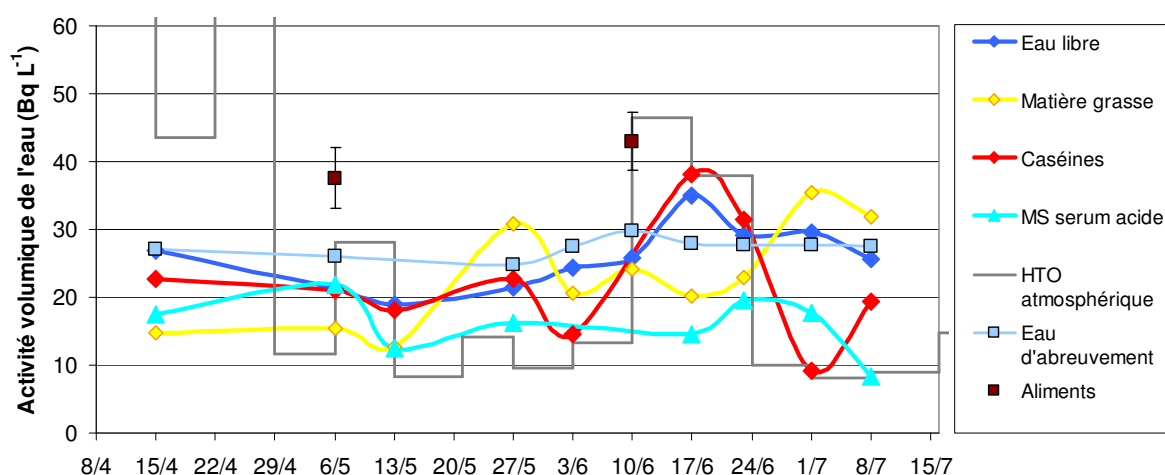
Afin de préciser la variabilité des différents paramètres mesurés dans les parties précédentes, l'exploitation de Larçon a été suivie entre le 8 avril 2013 et le 8 juillet 2013. Durant cette période, un **barboteur** a été installé dans l'étable afin de mesurer l'activité volumique de l'air ambiant. Compte tenu de la faible biodisponibilité du HT, seul le HTO est considéré. Les

flacons sont prélevés et remplacés hebdomadairement. Les autres prélèvements réalisés l'ont été dans la même matinée.

11 prélèvements de lait ont été réalisés. Pour 10 d'entre eux, la **matière grasse** et les **caséines** ont été séparées du sérum. Le **TOLne** ainsi que l'activité volumique de l'eau libre sont considérés. L'eau de l'exploitation a été prélevée et son activité volumique mesurée. Compte tenu du mode d'alimentation, l'activité volumique de l'eau de combustion de la ration alimentaire après **rinçage isotopique** peut être considérée constante durant la période de prélèvement (moyenne des deux mesures faites :  $40,3 \text{ Bq L}^{-1}$ ).

L'ensemble des résultats du suivi de l'exploitation de Larçon est synthétisé dans la **Figure 5-21**.

On observe d'abord que, hormis l'activité volumique de la vapeur d'eau atmosphérique mesurée au début de la période de prélèvement (qui atteint  $133 \text{ Bq L}^{-1}$  la semaine du 22 au 29 avril 2013), les activités volumiques mesurées sont globalement dans le même ordre de grandeur. De ce fait, avec ce seul jeu de données et compte tenu du nombre de répétitions pour chaque mesure, les tests statistiques n'ont pas la résolution suffisante dans la plupart des cas pour rendre compte des corrélations entre éléments suivis.



**Figure 5-21 : Variations des activités volumiques des eaux de combustion des fractions organiques du lait de l'exploitation de Larçon, de l'eau libre du lait, de l'eau d'abreuvement et de l'eau atmosphérique entre le 8 avril 2013 et le 8 juillet 2013**

Un seul couple de valeurs apparaît corrélé selon le test de Spearman : l'activité volumique des **caséïnes** et l'activité volumique de l'eau atmosphérique. Compte tenu de la faible importance, *a priori*, de l'eau atmosphérique dans le métabolisme d'une vache, il est certainement plus pertinent de considérer que cette corrélation apparente est indirecte. En effet, compte tenu du mode de stockage du **maïs d'ensilage** (qui constitue une très grande proportion de la ration alimentaire quotidienne) et des autres aliments produits par l'exploitation ainsi que de la durée pendant laquelle la ration alimentaire reste au sol avant d'être consommée et la surface d'échange aliments/air ambiant, l'eau que le bol alimentaire contient (près de 75 %) et la fraction échangeable de sa matière sèche se mettent efficacement à l'équilibre avec l'eau atmosphérique.

Bien que cela ne soit pas confirmé par le test de Spearman (avec un risque  $\alpha$  à 5 %), on observe que les **caséïnes** semblent être également corrélées à l'eau libre du lait.

Celle-ci apparaît d'ailleurs comme suivant une évolution de l'activité atmosphérique tamponnée par celle de l'eau d'abreuvement. Il est d'ailleurs possible d'établir un lien entre ces 3 paramètres (26) :

$$A_{TFWT} = 0,9558 \times A_{eau} + 0,0345 \times A_{atmosphérique} \quad (26)$$

Le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de cette équation avec nos valeurs expérimentales est de 0,9738.

Les variations de l'activité volumique de l'eau de combustion de la **matière grasse** du lait nous interpellent car elles ne semblent suivre aucune autre variation alors qu'elles ont les amplitudes parmi les plus importantes : plus d'un facteur 2 entre les valeurs minimale et maximale observées. L'hypothèse d'une origine métabolique a été explorée, notamment en cherchant une relation avec les évolutions des températures quotidiennes maximales la veille du prélèvement (**Figure 5-22**). Il a en effet été montré par de nombreux auteurs (D'Hour et Coulon, 1994 ; Decaen et Journet, 1966 ; Mathieu, 1942 ; Pelletier *et al.*, 1985) que le stress dû à la chaleur, même dans des climats tempérés, induit des diminutions de la quantité et de la qualité du lait produit par un cheptel, et ce avec une période de 24 h (D'Hour et Coulon, 1994). Sur la **Figure 5-22**, on observe que l'activité volumique de l'eau de combustion de la **matière grasse** et la température maximale atteinte la veille du prélèvement paraissent corrélées négativement, limitant ainsi l'influence de la modification de l'activité de l'eau libre



du lait sur celle de la matière. Aucun traitement statistique n'a cependant permis de confirmer ces observations.

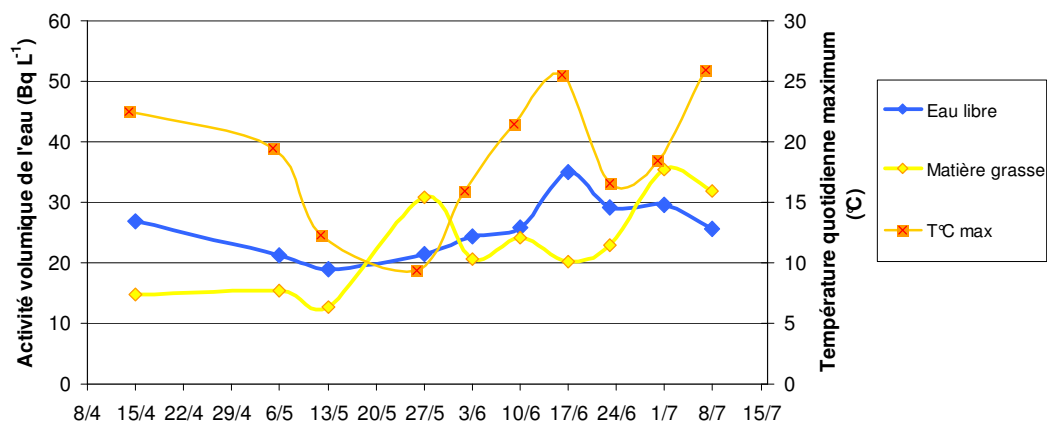


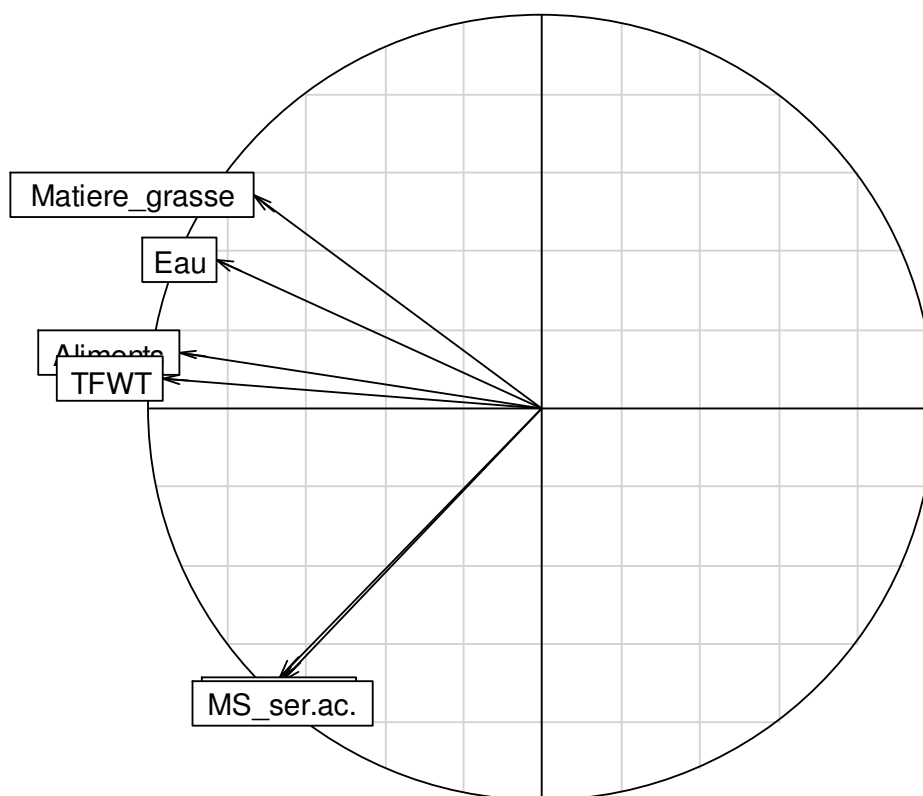
Figure 5-22 : Comparaison des variations de l'activité volumique de l'eau de combustion de la matière grasse du lait avec celles de l'eau libre du lait et de la température maximum atteinte la veille du prélèvement

Une autre hypothèse repose sur le fait que la composition du bol alimentaire a évolué à la fin du mois de mai 2013 : de l'enrubannage de l'année a été ajouté, réduisant ainsi la part que représente le **maïs d'ensilage** dans l'alimentation. On peut supposer que la variation de la digestibilité du bol alimentaire ait nécessité un ajustement métabolique avant de pouvoir parfaitement digérer la ration et que, durant cette adaptation, l'organisme a mobilisé ses graisses de stockage pour palier aux carences liées au moins bon rendement de digestion.

## 5. Synthèse des résultats sur le lait

A partir des données récoltées à Larçon lors du suivi de l'exploitation durant 3 mois, il a été possible de mettre en évidence une relation très nette entre l'eau libre du lait et l'eau de l'environnement (eau d'abreuvement et eau atmosphérique). Une relation plus inattendue est également apparue entre les **caséines** du lait et l'activité de l'eau atmosphérique. Celle-ci est d'autant plus surprenante que les amplitudes des variations des deux éléments sont tout à fait du même ordre de grandeur dans la période considérée.

Le suivi de Larçon permet également de compléter le jeu de données obtenues lors des deux campagnes de prélèvements. Le plus grand nombre de répétition pour chaque mesure ainsi que les plus grandes variations des valeurs pour chaque élément mesuré permettent une recherche de corrélation sur les autres compartiments considérés. L'ensemble des corrélations mises en évidence sont représentées dans la **Figure 5-23**.



**Figure 5-23 : Cercle des corrélations d'une analyse par composantes principales réalisée sur l'ensemble des échantillons de lait traités (l'étiquette « Caséines » est sous l'étiquette « MS\_ser.ac. »).**

Sur la base de cet ensemble de résultats, il est notamment possible de mettre en évidence une relation entre les rapports isotopiques  $T_{ne}/H_{ne}$  de la **matière grasse** et l'eau libre du lait (comme cela avait été évoqué dans la section 4 de cette partie, sur la seule base du suivi du lait de Larçon). Ainsi, on peut établir la relation (27). Le  $R^2$  calculé pour cette régression est de 0,890.

$$\frac{T_{ne}_{(matière\_grasse)}}{H_{ne}_{(matière\_grasse)}} = 0,86 \times \frac{T_{(TFWT)}}{H_{(TFWT)}} \quad (27)$$

Une corrélation est également mise en évidence entre l'activité volumique de l'eau de combustion de la **matière grasse** et l'eau d'abreuvement. Cependant, compte tenu de la forte corrélation entre l'eau libre et l'eau d'abreuvement (test de Spearman : p-value << 0,05)

d'une part et entre l'eau libre et l'eau de combustion de la **matière grasse** d'autre part (test de Spearman : p-value << 0,05), il est plus pertinent de considérer que la corrélation eau d'abreuvement/eau de combustion de la **matière grasse** est indirecte.

Bien que la corrélation entre les activités volumiques de la **matière grasse** du lait et de l'alimentation soit moins perceptible, un modèle exprimant le rapport Tne/Hne de la **matière grasse** en fonction de celui de l'alimentation et de l'eau libre (28) améliore le coefficient de corrélation ( $R^2 = 0,913$ ) :

$$\frac{Tne_{(matière\_grasse)}}{Hne_{(matière\_grasse)}} = 0,44 \times \frac{T_{(TFWT)}}{H_{(TFWT)}} + 0,20 \times \frac{Tne_{(Alimentation)}}{Hne_{(Alimentation)}} \quad (28)$$

Une bonne corrélation existe également entre l'activité volumique mesurée sur l'eau de combustion de la **matière grasse** et de l'alimentation (test de Spearman : p-value < 0,05). Cependant, compte tenu de la bonne corrélation dans nos valeurs entre l'activité volumique de l'eau de combustion de la ration alimentaire après **rinçage isotopique** et l'eau d'abreuvement (test de Spearman : p-value << 0,05) due au fait que le suivi a été opéré dans le cadre d'une **exposition** chronique en conditions environnementales, cette corrélation peut n'être qu'apparente. La faible teneur en lipides de la ration alimentaire ne permet pas d'estimer correctement son activité tritium tant il est possible que celle de la ration entière n'en soit pas représentative. Lors du suivi de Larçon, alors que la ration alimentaire n'a pas (ou peu) évolué, les variations des activités de la **matière grasse** ont été importantes. Pourtant, dans le métabolisme des vaches laitières, la contribution des lipides à la **matière grasse** du lait est importante (près de 50 %). Des expériences complémentaires seraient donc nécessaires pour mieux déterminer les relations entre les activités tritium de l'eau libre, de l'alimentation (et notamment des lipides qu'elle contient) et de la **matière grasse**.

Pour explorer la question du métabolisme lié à la température, d'autres campagnes de suivi dans le temps seraient nécessaires. Le regroupement des résultats des deux expériences (comparaison entre les 4 exploitations et suivi de Larçon) ne donne pas de complément d'information.

Les **caséines** et la matière sèche du sérum acide (essentiellement constitué de **lactose**) présentent également des activités tritium bien corrélées. Les activités entre les deux fractions

peuvent être reliées par la relation (29). Le coefficient de détermination de cette régression est de 0,898.

$$\frac{Tne_{(MSserum\_acide)}}{Hne_{(MSserum\_acide)}} = 0,72 \times \frac{Tne_{(caséines)}}{Hne_{(caséines)}} \quad (29)$$

Un meilleur coefficient de corrélation (0,911) est obtenu en faisant entrer l'eau libre dans la relation entre les deux fractions organiques (30).

$$\frac{Tne_{(MSserum\_acide)}}{Hne_{(MSserum\_acide)}} = 0,55 \times \frac{Tne_{(caséines)}}{Hne_{(caséines)}} + 0,28 \times A_{TFWT} \quad (30)$$

Compte tenu de ce que nous connaissons des métabolismes de la digestion et de la lactation, ces deux relations apparaissent cependant artificielles. Elles montrent que les **caséines** et la matière sèche du sérum acide ont des origines proches. Cependant, la contribution de l'eau libre de l'organisme (dont l'eau libre du lait est représentative) aux hydrogènes non-échangeables de la matière sèche apparaît plus importante dans les constituants du sérum acide que dans les **caséines**.

Du coup, deux relations peuvent être établies : une entre les **caséines**, l'alimentation et l'eau libre (31) et l'autre entre la matière sèche du sérum acide, l'alimentation et l'eau libre du sérum (32). Les coefficients de corrélation de ces deux relations avec nos données expérimentales sont moins hauts (respectivement 0,849 et 0,856) mais les relations sont plus pertinentes d'un point de vue métabolique.

$$\frac{Tne_{(caséines)}}{Hne_{(caséines)}} = 0,50 \times A_{Alimentation} + 0,27 \times A_{TFWT} \quad (31)$$

$$\frac{Tne_{(MSserum\_acide)}}{Hne_{(MSserum\_acide)}} = 0,37 \times A_{Alimentation} + 0,23 \times A_{TFWT} \quad (32)$$

Dans les parties 4 et 5, nous avons cherché à mettre en évidence les relations entre la matière organique constitutive des végétaux et du lait produits avec les conditions d'**exposition** chronique à du tritium atmosphérique qui sont celles des environs de Valduc. Nous avons notamment montré que toutes les molécules constitutives d'une matrice biologique n'avaient pas le même rapport isotopique dans la fraction non-échangeable de leur hydrogène et mis en évidence des corrélations fines. Dans la partie suivante, nous allons changer d'échelle afin de voir quelles sont les relations entre les différents compartiments à l'échelle de l'écosystème.



# **Partie 6. Circulation du tritium dans un écosystème**

Dans les parties 4 et 5, la tritiation de végétaux et du lait (en tant que matrice d'origine animale) a été traitée de manière indépendante. Afin de compléter cette approche, la circulation du tritium, de son émission atmosphérique jusqu'au lait, comme produit de grande consommation, va être étudiée dans cette partie en tenant compte des différents facteurs qui influencent le marquage tritium et des facteurs apparents de transfert.

# 1. De l'émissaire au point de mesure

## 1.1. Circulation atmosphérique

L'**oxydation** du HT en HTO dans l'atmosphère étant très lente (voir Partie 1.3.2), la circulation du tritium dans l'atmosphère, qu'il soit émis sous forme de HT ou HTO, est essentiellement régie par des lois physiques. Les caractéristiques de l'émission (formes rejetées, hauteur du rejet, débit, etc.) et les conditions météorologiques (vitesse et direction du vent, gradient thermique, pression atmosphérique, voire l'intensité du rayonnement solaire incident) sont les principaux facteurs qui influencent la propagation du tritium.

De son point d'émission jusqu'à un point de prélèvement, plusieurs mécanismes modifient les caractéristiques du panache. On peut globalement considérer que deux transformations sont en jeu : l'**advection**, c'est-à-dire le déplacement du panache dans l'espace, et la dispersion, qui englobe les phénomènes conduisant à une modification de la géométrie du panache (ou de la bouffée) et une dilution (Caussade, 2010). Dans l'atmosphère, la part de la dispersion due à la diffusion moléculaire (coefficient de diffusion de l'HTO dans l'air :  $2,3 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  selon Belot *et al.*, 1996 et Patryl et Guétat, 2006) est négligeable devant celle liée aux turbulences (vitesse variant de  $\sim 1 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  en conditions stables à  $100 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  en conditions instables) (Seigneur, 2012).

Les modèles généralement utilisés pour la circulation du tritium dans l'atmosphère sont de type gaussiens (IAEA, 2003). Ces modèles parviennent en moyenne à estimer, à un facteur 2 près, les valeurs mesurées en conditions environnementales.



Selon le modèle GASCON, l'activité volumique de l'air en tritium aux alentours de Valduc évolue schématiquement avec la distance depuis l'émissaire suivant la relation (33) pour une direction de vent et un azimut donnés :

$$A_{atm\_d_2} = A_{atm\_d_1} \times \left( \frac{d_2}{d_1} \right)^{-\sqrt{2}} \quad (33)$$

avec :

$A_{atm}$  : activité volumique de l'air en tritium ( $Bq\ m^{-3}$ )

$d_1$  et  $d_2$  : distances depuis l'**émissaire**, dans le même azimut.

## 1.2. Transferts Air/Sol et Air/Eau

Plusieurs processus sont à l'œuvre dans les relations entre l'atmosphère et le sol : le dépôt (qu'il soit sec ou humide), l'**oxydation** du HT en HTO et l'évaporation.

Le dépôt sec est la seule voie de transfert de l'HT au sol (celui-ci n'étant que très peu soluble dans l'eau) et une voie de transfert à prendre en compte pour l'HTO (IAEA, 2003). HT et HTO n'ont pas les mêmes vitesses de dépôt au sol. Elles sont respectivement comprises entre  $10^{-5}\ m\ s^{-1}$  et  $10^{-3}\ m\ s^{-1}$  (on retient généralement  $3\ 10^{-4}\ m\ s^{-1}$ ) et entre  $10^{-3}\ m\ s^{-1}$  et  $10^{-2}\ m\ s^{-1}$  (Patryl et Guétat, 2006). La nature du sol, son humidité ainsi que sa couverture végétale sont des éléments qui influent directement sur la vitesse du dépôt sec. Le HT est rapidement oxydé en HTO dans les premiers centimètres du sol (voir Partie 1.3.2). Considérant la faible vitesse de dépôt du HT et, dans le cas de Valduc, sa contribution inférieure à celle de l'HTO à l'activité tritium rejeté, la contribution de l'HTO issu de l'**oxydation** du HT déposé est négligeable.

Le dépôt humide correspond à l'entraînement du tritium par les précipitations. Il ne concerne donc que l'HTO. L'activité de l'eau de pluie arrivant au sol dépend :

- de l'activité initiale de l'eau de pluie
- des caractéristiques de la pluie (diamètre des gouttes et vitesse)
- de l'activité volumique du panache
- des distances parcourues dans le panache (l'eau de pluie se charge en tritium) et de celle parcourue sous le panache (la pluie se décharge alors en tritium).

L'HTO du sol peut s'évaporer et constituer alors une source secondaire. L'activité de l'eau ainsi évaporée est moins forte que l'eau du sol, par le mécanisme de discrimination isotopique décrit par la formule de Rayleigh (7) (se rapporter à la Partie 3.2 pour plus de détails). Cependant, cette source est généralement secondaire dès lors qu'on se situe à plus de 500 m de l'**émissaire** (IAEA, 2003).

L'eau du sol qui n'est ni évaporée ni absorbée par les plantes peut rejoindre la circulation souterraine de l'eau. Durant ces transferts, l'eau est en contact avec différents composés, organiques ou minéraux (**acides humiques** et **fulviques**, particules d'argile fine, etc.). Une partie de l'eau est alors adsorbée par les molécules hydrophiles, sous forme d'eau d'hydratation ou dans d'autres types de relation avec la matière. Cette fraction d'eau, dite liée, semble s'enrichir en HTO (Ota *et al.*, 2007 ; Teng *et al.*, 2011). L'appauvrissement de l'eau libre n'est pas apparent compte tenu des dimensions relatives des fractions libre et liée. Cependant, l'eau liée enrichie peut être mobilisée en cas de **lixiviation** ou par des organismes vivants et constitue alors des bouffées dont l'activité volumique n'est pas attendue.

A nouveau, la multiplicité des éléments influant sur le transfert entre compartiments (notamment les caractéristiques du sol et les conditions météorologiques) ne permet pas d'établir un coefficient fixe de l'activité du sol par rapport à l'activité de l'air. L'AIEA considère que l'activité du sol peut être évaluée grossièrement à 30 % de celle de l'atmosphère (IAEA, 2003), ce qui concorde avec les observations moyennes faites dans les environs de Valduc (Guétat *et al.*, 2013).

Comme cela a été évoqué dans la Partie 3.1, des échanges rapides entre l'eau atmosphérique et l'eau liquide tendent à mettre les deux compartiments à l'équilibre isotopique. La **cinétique** de l'échange dépend du gradient d'activité volumique entre la vapeur d'eau de l'air et l'eau liquide ainsi que de la surface d'échange entre les deux compartiments. En milieu continental, comme à Valduc, l'effet de cet échange sera peu sensible sur les eaux circulantes du fait des volumes d'air et d'eau en jeu et de la rapidité de la circulation des deux masses. En revanche, dans le cas des eaux stagnantes, si le taux de renouvellement est faible et que la surface de contact est importante par rapport au volume du réservoir, cet effet peut être tout à fait sensible, jusqu'à atteindre l'égalité entre activité de l'eau atmosphérique et celle du plan d'eau en situation d'**exposition** chronique (Horton *et al.*, 1971).

## 2. L'intégration dans les plantes depuis l'atmosphère et le sol

Les différents mécanismes d'intégration du tritium par les plantes ont été évoqués dans la Partie 1.3.3. L'objectif de cette partie est de faire la synthèse des connaissances sur les constantes d'équilibres lors des passages d'un compartiment à un autre.

### 2.1. HTO : de l'environnement à l'eau libre

Que ce soit dans la littérature ou dans nos résultats, il n'y a pas d'effet isotopique sensible spécifique au transfert de l'eau depuis l'environnement vers l'eau libre de l'organisme. Les effets isotopiques qui agissent sur ces transferts sont dus aux changements de phase ou à la rétention préférentielle de HTO dans l'eau liée, notamment au niveau du sol. La détermination de ces constantes est rendue difficile par la dualité de l'origine de l'eau : eau du sol et eau atmosphérique, aux activités volumiques variant dans ces compartiments à des rythmes très différents, et à l'existence possible de plusieurs compartiments d'eau (d'un côté l'eau des tissus et des vaisseaux, de l'autre, l'eau disponible pour la **photosynthèse**).

En considérant la relation établie par Belot entre l'activité volumique de l'eau libre de la plante et celle des eaux du sol et de l'atmosphère (20) et en considérant que l'activité volumique de l'eau du sol est en moyenne 30 % de celle de l'eau atmosphérique et que l'humidité relative de l'air a été de 80 % à Valduc entre le 1<sup>er</sup> avril et le 8 juillet 2013, l'activité volumique moyenne de l'eau libre de la plante durant cette période est en moyenne 86 % de celle de l'eau atmosphérique. Les valeurs du tritium total mesurées sur nos échantillons et présentées dans la Partie 4.2.1 sont cohérentes avec cette estimation. Les écarts observés sont notamment dus au fait que la **demi-vie** biologique de l'eau libre des plantes herbacées est inférieure à l'heure (voir Partie 1.3.3.1) alors que les valeurs de l'activité volumique de la vapeur d'eau atmosphérique obtenues par **barbotage** sont des moyennes sur une semaine.

Le fractionnement isotopique lors des changements de phase de l'eau peut avoir une incidence majeure sur le métabolisme des végétaux. En effet, l'évaporation de l'eau vers la **chambre sous-stomatique**, qu'elle se fasse depuis les parois cellulaires du **mésophylle** ou depuis la face interne des cellules de l'épiderme inférieur des feuilles, doit conduire à un enrichissement sensible en tritium de l'eau liquide à la surface de ces cellules (compte tenu des conditions de pression et de température à laquelle l'évaporation se fait). Les effets de ce mécanisme peuvent être atténués par la mise en équilibre permanente de cette fraction d'eau avec celle des tissus et de l'atmosphère. Compte tenu de l'importance de ces phénomènes, il semble nécessaire de vérifier ces hypothèses.

## 2.2. De l'eau libre au TOLe

Dans les études menées sur les végétaux ainsi que dans les expériences de tritiation de matière organique en position échangeable, il n'a pas été observé de discrimination isotopique. A l'équilibre, les rapports T/H de l'eau et de la fraction échangeable de l'hydrogène de la matière sèche considérée sont donc égaux. Cependant, la **cinétique** de la tritiation en position échangeable dépend de l'accessibilité des hydrogènes labiles de la matrice considérée.

Dans (Guénot, 1986), l'auteur a exposé durant 4 h des plants de vignes et de pommes de terre à une atmosphère tritiée. Après cette **exposition**, des feuilles ont été prélevées pour être déshydratées avant de subir un **échange labile**. La comparaison de l'activité tritium récupérée lors de l'échange avec l'activité volumique de l'eau libre extraite des échantillons montre une bonne corrélation et permet à Guénot de déduire d'après ses données expérimentales que 21,3 % de l'hydrogène de la matière sèche est en position échangeable. En comparant ces résultats avec un calcul réalisé en prenant la composition d'une feuille de vigne (Division de la Recherche sur le Nutrition, 2010) et la fraction d'hydrogène échangeable de ses composants (Tableau 3-3), on observe une différence de près de 5 %. Cette valeur est tout à fait cohérente avec les dernières estimations faites sur le biais imputable au « **tritium enfoui** » dans l'évaluation du **TOLne** (Kim et Korolevych, 2013). On observe donc qu'aucun effet de discrimination isotopique n'est décelable dans les résultats de ces expériences, quelle que soit l'accessibilité à l'échange des hydrogènes labiles.

## 2.3. Fractionnement isotopique lors de la synthèse de **TOLne**

Alors que cette question anime la communauté scientifique depuis près de 40 ans, elle semble toujours aussi complexe à trancher. Le premier problème est celui de mesurer le **TOLne**. La cellulose et autres fibres **polymères** de **glucose** étant les principaux constituants de la matière sèche des végétaux et leur conformation supra-moléculaire rendant particulièrement difficile et/ou lente la mise en équilibre de la fraction « **enfouie** » de leur hydrogène, la juste mesure du **TOLne** ne semble pas encore systématique. Bien que des études récentes concluent à une faible influence du **tritium enfoui** dans la quantification du **TOLne**, la variabilité du rapport **TOLe/TOLt** en conditions environnementales observée dans la Partie 4.1.3 laissent penser que cette conclusion ne reflète pas l'ensemble des situations possibles.

A cette difficulté dans la séparation de la fraction non-échangeable de l'hydrogène de la matière sèche s'ajoute généralement la non-prise en compte du mécanisme de dilution du **TOLne** induit par le **rinçage isotopique**. Cela conduit à une mauvaise évaluation du rapport **Tne/Hne** dans la matrice étudiée et donc à l'incapacité de conclure à l'existence ou non d'un fractionnement isotopique. Pour que les expériences en conditions contrôlées amènent des résultats pertinents, il est nécessaire de connaître les activités volumiques de l'eau du sol et de la vapeur atmosphérique ainsi que leur contribution relative dans la synthèse du **TOLne**, ce qui est rarement le cas. Des méthodes de prélèvements du sol manquent pour pouvoir produire des échantillons dont la période de représentation soit comparable à celle de **barboteurs**. Enfin, pour les études de transferts environnementaux, à ces problèmes s'ajoute la nécessité de suivre l'évolution des activités des différents compartiments (aux cinétiques très différentes) ainsi que l'évolution de la biomasse pour permettre d'obtenir des résultats exploitables.

Pour illustrer cela, le Tableau 3-4 montre qu'en moyenne le rapport **Tne/Hne** obtenu après correction des RAS de la littérature est de 1,69 pour les données environnementales et de 0,62 dans les expériences d'**exposition** chronique en conditions contrôlées. Les premières données montrent un enrichissement de près de 70 % alors que les secondes indiquent un appauvrissement du même ordre de grandeur !

Les résultats obtenus dans la Partie 4.2.2 sur les fractions séparées depuis la matière sèche d'épis de blé, d'orge et sur des **cosses** de colza montrent une variation significative des rapports Tne/Hne pour deux échantillons d'un même blé prélevés à un mois d'intervalle ainsi que sur les fruits du colza. Les autres échantillons ont des rapports très proches sur l'ensemble des fractions séparées. Ici non plus, il n'est pas possible de conclure à une discrimination isotopique au cours de la synthèse de tel ou tel composé faute d'un nombre suffisant de répétitions.

Il apparaît nécessaire de poursuivre les investigations sur la question de l'intégration du tritium dans le **TOLne** des végétaux. Il semble d'abord primordial, d'un point de vue fondamental, de comprendre les mécanismes qui conduisent à une corrélation particulièrement forte entre le **TOLne** synthétisé et la vapeur d'eau tritiée de l'atmosphère, en dépit de la conception classique des flux d'eau dans la plante. L'identification du compartiment dans lequel la plante puise l'eau nécessaire à la **photosynthèse** est également nécessaire : *est-ce une eau bien représentée par le TFWT ou un compartiment à part, avec son propre rapport T/H ?* Ensuite, la contribution respective de l'eau du sol et de l'eau atmosphérique doit être correctement évaluée pour l'espèce étudiée préalablement à l'évaluation du fractionnement isotopique au cours de la **photosynthèse**. Enfin, la tritiation comparée des différents constituants organiques d'une plante ou d'un de ses organes doit faire l'objet d'études robustes afin d'apporter des éléments de réponse sur la question d'éventuels fractionnements isotopiques au cours des biosynthèses secondaires. Une des difficultés de cette étude consiste alors en le maintien d'une activité volumique de l'eau libre constante ou bien contrôlée. Dans le cas contraire, les synthèses secondaires réalisées avec une eau moins tritiée (ou plus tritiée) ne permettraient pas d'interpréter une dilution (ou une concentration) du **TOLne** au cours des synthèses secondaires.

### 3. Intégration du tritium par les animaux

Comme pour les végétaux, les mécanismes en jeu et les grands principes qui régissent l'incorporation du tritium par les animaux ont été traités dans la bibliographie (Partie 1.4.1).

Notre étude a permis de mettre en évidence des relations étroites et assez fines entre les activités tritium de l'eau d'abreuvement, de l'alimentation et des principales fractions du lait.

### 3.1. L'eau libre et le **TOLe**

Comme nous l'avons vu dans la Partie 5.3.3.1, le **TFWT** des vaches, dont l'eau libre du lait est représentative (Pinson et Langham, 1957), résulte essentiellement de 4 apports : l'eau d'abreuvement, l'eau des aliments, l'eau résultant du métabolisme et, dans une moindre mesure, l'eau inspirée. Les contributions de ces 4 voies d'apports à l'activité volumique de l'eau libre sont très variables. Outre les différences d'activités entre elles, leur importance relative dans les apports nécessaires varient également entre exploitations et au cours du temps. La conduite des cheptels, notamment par la composition de l'alimentation et sa teneur en eau, est un facteur qui induit des variations sensibles entre exploitations mais est relativement stable sur l'année au sein de chacune de celles étudiées. Les conditions climatiques sont également susceptibles d'induire des modifications sensibles : l'élévation de la température, avec une ration alimentaire stable en quantité et en composition, induit un plus grand besoin d'abreuvement. Ces variations sont d'autant plus difficiles à observer en conditions environnementales qu'elles sont très rapides.

Les relations que nous avons mises en évidence dans notre étude sur les différents cheptels montrent qu'il n'y pas de variation sensible entre l'activité volumique de l'eau ingérée (lors de l'abreuvement et de l'alimentation) et le **TFWT** des cheptels. La relation (26) et le  $R^2$  associé ( $> 0,95$ ) laissent peu de place au doute.

La mise en équilibre isotopique du **TOLe** avec les autres hydrogènes labiles de la matrice étudiée est régie exactement par les mêmes mécanismes dans les animaux que dans les végétaux. Les conclusions sur les constantes de transfert entre **TFWT** et **TOLe** sont donc les mêmes : il n'y a pas de discrimination isotopique apparente mais des **cinétiques** de mise en équilibre qui diffèrent entre les molécules organiques simples et les macromolécules aux conformations les plus complexes dans lesquelles on trouve « **l'hydrogène enfoui** ».

La validation définitive de ce constat se heurte cependant à un obstacle méthodologique : comment vérifier l'absence de discrimination isotopique entre **TFWT** et **TOLne** alors que l'extraction d'eau préalable à la mesure du **TOLt** et du **TOLne** induit une discrimination isotopique ? Si des rapports isotopiques différents étaient observés entre l'eau libre et l'hydrogène échangeable, comment faire la part entre l'effet de l'extraction d'eau et l'équilibre initial au sein de la matrice ?

### 3.2. Le **TOLne** dans le lait

Dans la Partie 5.5, des relations ont pu être établies entre les aliments et le **TFWT** (comme résultante des différents apports d'eau comme vu dans la section précédente). Nous allons analyser ces résultats sous l'angle du transfert du tritium entre compartiments.

Les relations qui lient les rapports isotopiques de la fraction non-échangeable de la **matière grasse** (28), des **caséines** (31) et de la matière sèche du sérum acide (32) à ceux des aliments et de l'eau libre du lait sont difficilement interprétables en termes de discrimination isotopique. En effet, si on considère chacun des coefficients déterminés pour associer les **TFWT** et  $T_{ne}/H_{ne}$  des aliments à celui de chacune des fractions organiques du lait comme étant des contributions relatives, on peut considérer qu'il y a un appauvrissement isotopique au cours des métabolismes qui conduisent à la synthèse des constituants organiques du lait, la somme de ces coefficients étant généralement inférieure à 1.

Cependant, le **TFWT** et le **TOLne** des aliments présentent des rapports isotopiques proportionnels, celui du **TOLne** des aliments étant, en moyenne, deux fois celui du **TFWT** ( $R^2 = 0,9008$ ). Il est donc difficile de déterminer les contributions respectives des deux sources d'hydrogène aussi nettement que les  $R^2$  des relations le laissent penser. Les spécificités du métabolisme de la digestion chez les ruminants rendent en effet ces relations complexes puisque peu de nutriments ingérés sont absorbés sans subir des transformations importantes (voir la Partie 5.3.3.2.2). Cette simplification extrême des molécules entre l'ingestion et le métabolisme propre à la vache (et à la lactation pour ce qui concerne notre étude) multiplie les contributions possibles de l'eau à l'**hydrogénation** des molécules



organiques lors des réactions de synthèses. Cela ressort d'ailleurs bien dans les différentes relations établies.

Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer s'il y a, à proprement parler, des mécanismes induisant des discriminations isotopiques entre l'ingestion des aliments et l'abreuvement d'une part et la synthèse du lait d'autre part. Il sera nécessaire pour cela de mieux maîtriser la composition du bol alimentaire et l'activité tritium de ses nutriments, de suivre les activités volumiques des métabolites intermédiaires synthétisés dans le rumen (protéines bactériennes et AGV par exemple) et de mesurer l'activité tritium des précurseurs des composants du lait.

Les différences observées dans les rapports isotopiques Tne/Hne entre les principaux composants organiques du lait, notamment le fait que la **matière grasse** présente systématiquement un rapport isotopique inférieur à celui des **caséines** ou de la matière sèche du sérum acide (voir la **Figure 5-16** et la **Figure 5-17**) ne doivent pas forcément être interprétées comme une discrimination isotopique négative plus marquée (ou une discrimination isotopique positive moins marquée) pour la **matière grasse** que pour les **caséines** et la matière sèche du sérum acide. Elles peuvent également être le signe de contributions différentes de l'hydrogène apporté par les aliments et par l'eau libre entre les différentes fractions. Cela est rendu très perceptible dans le suivi de l'exploitation de Larçon d'avril à juillet 2013 (**Figure 5-21**) où il apparaît évident que des variations métaboliques (quelle qu'en soit l'origine ou la cause) sont susceptibles de complètement modifier ces équilibres et les contributions respectives des apports d'hydrogène à l'hydrogène non-échangeable des molécules sécrétées.

Cela étant dit, dans une situation telle que celle des exploitations voisines de Valduc (**exposition** chronique de l'ensemble de l'exploitation), on note que le rapport isotopique des différents composants organiques du lait est systématiquement compris entre ceux de l'eau libre et de la matière sèche des aliments. Si on ne peut pas conclure sur la présence ou non de discrimination isotopique dans les métabolismes, on souligne l'importance des mécanismes de dilution.

Compte tenu de la diversité des sources d'hydrogène pour un organisme donné (ou un système donné) et la dilution des sources d'hydrogène aux rapports isotopiques les plus élevés par les autres contributions, les éventuels effets de discrimination isotopique ne sont pas perceptibles. En ce qui concerne la circulation des molécules organiques tritiées le long d'une chaîne alimentaire, le suivi de ruminants est peu représentatif de l'ensemble des animaux tant leur système digestif est original : la simplification systématique des nutriments et la réduction du nombre de molécules disponibles pour le métabolisme de la flore bactérienne du rumen réduisent les contrastes liés aux différences de nature : il n'y pas de nutriment essentiel, tout est synthétisé par les bactéries.





# Conclusion

Comme cela a été évoqué à plusieurs reprises dans ce manuscrit, l'eau est omniprésente dans l'environnement, l'hydrogène est très mobile dans la matière vivante et ses **cinétiques** d'échange, de transfert ou d'incorporation sont très variables (tout **isotope** confondu) en fonction des molécules chimiques qui le contiennent. Une grande rigueur dans l'établissement et le suivi des méthodes analytiques mais également dans la représentation de l'objet d'étude est donc indispensable pour pouvoir comparer des grandeurs effectivement comparables.

Dans les travaux préalables à l'étude environnementale, nous avons montré que les méthodes et les outils employés lors du traitement de l'échantillon avant la mesure de l'activité tritium de ses différentes fractions étaient susceptibles d'induire des biais sensibles dans les résultats obtenus. Nous avons mis en évidence des phénomènes de discrimination isotopique au cours de la distillation du lait sous pression réduite. La bonne représentation de ces phénomènes par le modèle à deux composantes que nous avons établi et la conception déjà établie de la coexistence dans le lait de deux fractions d'eau (l'une dite « libre », l'autre dite « liée ») nous a conduit à considérer les propriétés physiques très différentes entre l'eau liée et l'eau libre. Ces différences seraient à l'origine notamment de la discrimination isotopique originale qui a été mise en évidence lors de nos expériences. Selon notre hypothèse, l'eau liée à d'autres molécules très hydrophiles devrait présenter également des constantes de fractionnement isotopique sensiblement plus élevées que celle de l'eau pure. Ce phénomène peut induire une sous-estimation de la fraction du tritium dans l'eau d'une matrice et la surestimation de sa fraction organique, notamment non-échangeable. La dimension de ces biais induit une conséquence cependant faible (quelques pourcents) dans les évaluations d'impacts.

Sur la base d'une revue critique de la littérature relative au tritium dans l'environnement, nous avons également montré l'importance de caractériser correctement les compartiments étudiés pour permettre une comparaison pertinente des rapports isotopiques entre eux. Il a notamment été mis en évidence que la dilution isotopique générée par le rinçage du **TOLe** doit être corrigée par la fraction d'hydrogène non-échangeable pour bien mesurer le rapport isotopique  $T_{ne}/H_{ne}$  et ainsi pouvoir comparer celui-ci entre différents compartiments. Cette correction est de l'ordre de 1,05 à 1,50 au **RAS** (*relative specific activity* ou activité volumique relative) selon les matrices considérées.

L'étude environnementale a été établie afin d'apporter des éléments de réponse à différentes questions.

- **Quels sont les facteurs qui influencent la circulation du tritium dans un écosystème continental ?**

L'eau tritiée étant la principale forme d'émission à Valduc et étant la forme d'**oxydation** finale de la plupart des métabolismes, c'est la forme majeure du tritium dans l'environnement immédiat de Valduc. La grande mobilité de l'eau et le fait qu'elle participe à la plupart des réactions biochimiques, comme solvant ou réactifs, conduisent à ce que l'eau tritiée soit également le principal vecteur du tritium dans le biotope et les chaînes alimentaires. Le tritium sous forme organique non-échangeable circule via la prédation. Une fois sortie de la chaîne trophique (sous forme de fèces ou dans les urines), l'**oxydation** de la matière organique tritiée en HTO par les **détritivores** est certainement la voie préférentielle vers sa remobilisation par la **biosphère**.

**Quelles sont les constantes qui régissent les transferts entre compartiments ?**

Dans la Partie 6, nous avons montré que la multiplicité des flux d'hydrogène dans la biosphère et notamment le renouvellement rapide de l'eau des organismes, à toutes les étapes de leur vie, induisent un nivellement important des activités par une dilution rapide des compartiments aux activités les plus élevées par les autres sources d'hydrogène. Tous les écosystèmes étant en permanence traversés par des flux d'eau, ceux-ci seront généralement les principaux vecteurs de dilution.

Compte tenu des particularités de la digestion des vaches, ces mécanismes de dilution ne nous ont pas permis de mettre en évidence de constantes de discrimination isotopique propres aux transferts le long de leur chaîne alimentaire.

**La tritiation dans un système donné est-elle homogène ou existe-t-il des variations sensibles des rapports isotopiques ?**

La comparaison du rapport isotopique Tne/Hne de différentes composantes d'organes végétaux et du lait ont permis de mettre en évidence que celui-ci n'est pas constant au sein d'une matrice selon la forme chimique que l'on considère. Pour le lait, les résultats sont suffisamment nombreux pour que cette conclusion soit robuste. Pour les végétaux, notre

travail, qui n'était sur ce point qu'exploratoire, n'est pas conclusif. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour vérifier les observations qui ont été faites, notamment l'existence ponctuelle à Moloy d'un facteur 5 entre les Tne/Hne de l'amidon et du gluten d'épis de blé.

L'observation de ces variations dans les rapports isotopiques, que ce soit dans le lait ou les végétaux, est la preuve que des phénomènes de discrimination isotopique sont à l'origine de variations sensibles des rapports isotopiques au cours des réactions métaboliques successives. En revanche, la disparité des résultats observés dans la littérature et dans nos résultats indiquent que les phénomènes conduisant à ces variations de Tne/Hne ne sont pas tous orientés systématiquement vers l'enrichissement ou l'appauvrissement en tritium et n'ont pas la même intensité. Les variations importantes du rapport isotopique Tne/Hne dans les 3 fractions organiques du lait étudiées au cours du suivi de l'exploitation de Larçon mettent en évidence que des paramètres physiologiques sont susceptibles de faire varier les métabolismes, permettant ainsi de passer de l'enrichissement apparent à l'appauvrissement apparent en tritium d'une même fraction.

**Est-ce que la tritiation des maillons d'une chaîne alimentaire exposée chroniquement est constante ou varie-t-elle le long des niveaux trophiques ?**

La chaîne alimentaire suivie n'a pas permis d'apporter une réponse définitive à cette question. Du fait que l'activité des microorganismes du rumen conduit à une homogénéisation presque complète des nutriments absorbés avant de synthétiser les nutriments nécessaires aux vaches presque *de novo*, la vache n'est en pratique pas dépendante de nutriments essentiels (hormis l'eau). Il est donc fort improbable que son alimentation puisse conduire à la rétention préférentielle de tel ou tel nutriment ingéré. En revanche, il est tout à fait envisageable que les réactions de synthèse des bactéries ou de la vache conduisent à des molécules plus ou moins tritiées que la moyenne. A l'échelle à laquelle nous avons étudié les laits (en séparant eau, **matière grasse**, **caséines**, **lactose** et **protéines sériques**), nous n'avons pas pu démontrer l'existence de différences significatives et constantes entre ces fractions.

En conclusion, nous retiendrons donc 3 points essentiels :

- Il existe des situations de discrimination isotopique du tritium par rapport à l'hydrogène (changement de phase de l'eau, synthèse de matière organique végétale et animale).



- Les discriminations que nous avons observées sont variables en fonction des transferts entre compartiments et de paramètres physiologiques.
- L'ampleur des discriminations que nous avons observées n'est pas de nature à modifier l'évaluation des effets sanitaires du tritium, du fait notamment des dilutions isotopiques.

L'étude que nous avons menée a permis de mettre en évidence des questions encore sans réponse concernant la circulation du tritium dans l'environnement.

Tout d'abord, les mécanismes de discrimination isotopique lors de l'extraction d'eau d'une matrice nécessitent des compléments d'étude pour comprendre les origines physiques de nos observations. La meilleure compréhension de ces mécanismes permettra également de s'assurer que ce phénomène n'est pas à l'origine de biais dans la mesure du tritium organiquement lié total (**TOLt**) ou du tritium organiquement lié non-échangeable (**TOLne**) par la mise en équilibre des hydrogènes échangeables de la matière sèche avec les dernières fractions d'eau enrichie en tritium. Selon nos résultats, l'importance de ce phénomène devrait augmenter avec la force de liaison entre la matrice considérée et l'eau.

Les mécanismes à l'origine de la forte corrélation entre eau atmosphérique et matière organique élaborée par la **photosynthèse**, en contradiction apparente avec la conception classique des flux d'eau dans les végétaux, est également un sujet qu'il serait souhaitable d'approfondir. L'étude de la tritiation des molécules organiques constituant les végétaux, en particulier celles qui entrent dans notre alimentation et que nous sommes susceptibles d'assimiler, permettra d'augmenter la précision de l'évaluation de la circulation du tritium dans la chaîne alimentaire de l'Homme.

Si le lait de vache est un objet d'étude tout à fait intéressant pour les questions d'**écotoxicologie** et de **radioécologie**, il s'avère qu'il n'y a pas d'enrichissement en tritium en passant de la ration alimentaire de l'animal au lait. Il semble exister une certaine discrimination isotopique selon les composants du lait mais celle-ci peut évoluer dans le temps, en particulier lors des changements de ration.

Le métabolisme spécifique des ruminants ne permet pas d'obtenir des réponses extrapolables à d'autres animaux concernant le tritium. L'étude sur d'autres consommateurs primaires compléterait donc bien nos résultats. Enfin, la prise en compte des consommateurs secondaires (au régime carnivore au moins partiel) permettrait de compléter les connaissances sur la circulation du tritium dans les chaînes trophiques. Comme pour les végétaux, l'augmentation de la précision dans l'étude de la tritiation des molécules apparaît nécessaire pour une complète compréhension des mécanismes en jeu.





# Glossaire

## **Abiotique\***

Désigne un facteur écologique, un phénomène ou un processus de nature physicochimique, donc indépendant des êtres vivants, ou qui est entièrement contrôlé par des paramètres non biologiques.

## **Acides aminés (ou aminoacides)**

Composés organiques possédant à la fois un groupe carboxyle (-COOH) et un groupe amine (-NH<sub>2</sub>) dont le rôle biochimique est essentiel : ils sont les constituants élémentaires des protéines qu'ils forment par polymérisation via l'établissement de liaisons peptidiques : R-CO-NH-R', R et R' représentant des chaînes latérales distinctes.

## **Acides fulviques et humiques\***

Acides organiques provenant de la décomposition bactérienne des matières végétales mortes (cellulose, lignine) qui se forment au cours du processus d'humification.

## **Acide glutamique/glutamine**

Un des 20 acides- $\alpha$ -aminés naturels constituant les protéines. Sa formule brute est C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>.

## **Acide palmitique**

Acide gras saturé de formule brute C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>. Il est parmi les plus répandus des acides gras chez les animaux et les végétaux.

## **Acide stéarique**

Acide gras saturé de formule brute C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>. Il est parmi les plus répandus des acides gras chez les animaux et les végétaux (derrière l'acide palmitique).

## **ADN (Acide désoxyribonucléique)**

Molécule organique présente dans toutes les cellules vivantes qui renferme l'ensemble des informations nécessaires au développement et au fonctionnement d'un organisme. Sa structure standard est celle d'une double hélice droite composée de deux brins complémentaires, chacun composé d'un enchaînement de nucléotides.

## **Activité**

Terme qui désigne le nombre de désintégrations qui se produisent dans une matière radioactive par unité de temps. L'unité légale est le becquerel (Bq) qui correspond à une désintégration par seconde. Le curie (Ci) est l'ancienne unité (1 Ci = 37 milliards de désintégrations par seconde = 37 GBq).

1 gramme de tritium contient environ  $2 \cdot 10^{23}$  atomes et a une activité de  $3,6 \cdot 10^{14}$  Bq.

---

\* Définitions extraites du Dictionnaire Encyclopédique de l'Ecologie et des Sciences de l'Environnement, F. Ramade, Ediscience International, Paris, 1993, 822 p.

### **Activité de l'eau (Aw pour activity water)**

Grandeur représentant la pression de vapeur d'eau d'un produit humide divisée par la pression de vapeur saturante à la même température. Elle traduit les interactions de l'eau avec la matrice de l'aliment. Elle constitue ainsi un des facteurs influençant la conservation d'un aliment ou d'un produit pharmaceutique : plus la quantité d'eau disponible est élevée, plus l'Aw est proche de 1 et plus les micro-organismes pourront se développer.

### **Advection\***

Phénomène de transport aérien ou aquatique qui implique des échanges horizontaux entre masses d'air ou d'eau. Il s'agit donc d'un cas particulier de la convection qui joue un rôle important dans la dispersion des polluants.

### **Aérosol**

Un aérosol est un ensemble de particules, solides ou liquides, d'une substance chimique donnée en suspension dans un milieu gazeux.

### **AGV (acides gras volatils)**

Produits finaux de la digestion des fibres végétales par les microorganismes du rumen des vaches. Ils sont principalement constitués d'acide acétique (95 %), de l'acide propionique et de l'acide butyrique.

### **AIEA (Agence Internationale de l'Energie Atomique - acronyme anglais : IAEA)\***

Cette agence, dont le siège est basé à Vienne, a non seulement pour objet de contrôler l'application des traités de non-prolifération des armes nucléaires, mais aussi de favoriser le développement des usages pacifiques de l'énergie atomique, en particulier d'apporter un soutien technique pour le contrôle de la sûreté des installations nucléaires civiles.

### **Alanine**

Un des 20 acides- $\alpha$ -aminés naturels constituant les protéines. Sa formule brute est  $C_3H_7NO_2$ .

### **Aliphatique**

Adjectif décrivant un composé organique cyclique ou acyclique, linéaire ou branché, saturé ou insaturé, à l'exclusion des composés aromatiques.

### **Anabolisme\***

Processus par lesquels s'effectuent l'assimilation des nutriments et la synthèse des molécules biogéniques dans un organisme.

### **Atome**

Constituant de base des éléments chimiques formant la matière. Sa structure est représentée par un noyau constitué de particules électriquement positives et neutres (protons et neutrons) autour duquel gravitent des particules électriquement négatives (électrons).

---

\* Définitions extraites du Dictionnaire Encyclopédique de l'Ecologie et des Sciences de l'Environnement, F. Ramade, Ediscience International, Paris, 1993, 822 p.

**Autotrophe\***

Se dit d'un organisme capable de subvenir à ses besoins métaboliques à partir de sources de matières nutritives exclusivement minérales et en employant comme source d'énergie, soit le rayonnement solaire, ce qui est le cas écologiquement dominant dans la biosphère actuelle (photosynthèse), soit certains composés minéraux par des processus d'oxydation (chimiosynthèse).

**Aw**

Voir Activité de l'eau.

**Barbotage**

Méthode de prélèvement du tritium dans l'air consistant en le prélèvement de l'air atmosphérique à débit constant puis à la diffusion de l'air prélevé dans une eau de référence qui se chargera en eau tritiée par affinité chimique.

**Becquerel (Bq)**

Unité de mesure, légale et internationale, utilisée pour la radioactivité. Le Becquerel (Bq) est égal à une désintégration d'un noyau radioactif par seconde.

**Biopolymère**

Polymères produits par des êtres vivants. L'ADN, les protéines, la cellulose et l'amidon en sont quelques exemples.

**Biosphère\***

Région de la planète qui renferme l'ensemble des être vivants et dans laquelle la vie est possible en permanence.

**Biotique\***

Qui est propre à la vie.

**C3, C4 (Plantes en)\***

On distingue deux types de photosynthèse dits en C3 ou en C4 chez les plantes supérieures selon qu'il existe, dans le cycle de Calvin, une phase de photorespiration induite par une enzyme (le Rubisco ou ribulose biphosphate carboxylase) (plantes en C3) ou que cette dernière fasse défaut (plantes en C4). Les termes C3 et C4 font référence à un des sucres intermédiaires dans le cycle de Calvin de chacun de ces types, selon qu'il possède une chaîne à trois atomes de carbones ou à 4 atomes de carbone (absente chez les plantes en C3).

**Caséines**

Complexes organiques constitués de protéines sous forme d'une chaîne lâche et emmêlée qui fixe par des liaisons chimiques du phosphore et du calcium (Figure 5-9). Les caséines sont organisées en micelles, particules sphériques constituées également de quelques fragments peptidiques et de composés salins (calcium et phosphate). Les caséines ont un faible niveau

---

\* Définitions extraites du Dictionnaire Encyclopédique de l'Ecologie et des Sciences de l'Environnement, F. Ramade, Ediscience International, Paris, 1993, 822 p.

d'organisation secondaire, essentiellement en hélices  $\alpha$  et en feuillets  $\beta$ . Elles précipitent à un pH de 4,6 (Snappe et al., 2007).

**Catabolisme**\*

Processus physiologiques se traduisant par la dégradation des métabolites.

**Catalyse**

Phénomène de modification notable de la vitesse d'une réaction chimique par l'action d'une substance, appelée catalyseur.

**Catalyseur**

Substance par l'action de laquelle se produit la catalyse. Par définition, cette substance n'est pas consommée et est restituée à la fin de la réaction. Il n'apparaît donc pas dans le bilan de la réaction, ni dans son équation.

**Catalytique**

Se dit de ce qui est de la catalyse ou par un catalyseur.

**Chambre sous-stomatique**

Espace intercellulaire localisé dans le mésophylle dans lequel débouche le stomate.

**Cinétique**

Etude de la vitesse des réactions chimiques.

**CIPR (Commission Internationale de Protection Radiologique – acronyme anglais ICRP)\***

Organisation ayant pour objet la protection des diverses populations contre les rayonnements ionisants. Elle a défini des normes de radioprotection qui concernent à la fois les populations dans leur ensemble et les personnes exposées par leurs activités professionnelles à une irradiation.

**Coalescence**

Phénomène par lequel deux substances identiques mais dispersées ont tendance à se réunir.

**Cosses**

Enveloppe de la graine dans la famille des Légumineuses.

**Cultivars**

Terme agronomique utilisé pour désigner une variété sélectionnée de plante cultivée.

---

\* Définitions extraites du Dictionnaire Encyclopédique de l'Ecologie et des Sciences de l'Environnement, F. Ramade, Ediscience International, Paris, 1993, 822 p.



**Curie (Ci)**

Ancienne unité de mesure de la radioactivité, remplacée par le Becquerel (Bq).  
 $1 \text{ Ci} = 3,7 \cdot 10^{10} \text{ Bq}$

**Cystéine**

Un des 20 acides- $\alpha$ -aminés naturels constituant les protéines. Sa formule brute est  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$ .

**Décroissance radioactive**

L'activité d'un échantillon radioactif diminue avec le temps du fait de la disparition progressive des noyaux instables qu'il contient. La désintégration radioactive d'un noyau donné est un phénomène aléatoire. On peut cependant donner pour chaque isotope radioactif une période radioactive ou demi-vie qui est le temps au bout duquel la moitié des atomes radioactifs initialement présents a disparu par transformation spontanée.

**Demi-vie**

Temps mis par une substance pour perdre la moitié de son activité, qu'elle soit pharmacologique, physiologique ou radioactive. La demi-vie biologique d'un composé radioactif est le temps mis pour que l'organisme considéré perde la moitié de l'activité radioactive initiale.

**Désintégration (radioactive)**

Réduction progressive du nombre d'atomes instables (**radionucléides**) d'une substance causée par la **désintégration** spontanée des noyaux ou leur transformation en atomes différents, accompagnée de l'émission de particules et/ou de photons.

**Détritivore**

Catégorie d'être vivants qui se nourrissent de détritus d'origine végétale ou animale constituant la matière organique morte. Les détritivores se rencontrent dans tous les biotopes terrestres ou aquatiques.

**Discrimination isotopique**

Voir fractionnement isotopique.

**Eau libre**

En chimie, eau non liée, non retenue par les molécules ou particules hydrophiles. Par extrapolation, dans ce mémoire, comme dans la littérature sur le tritium, cette expression désigne l'eau qui peut être extraite d'une matrice par un procédé (distillation ou lyophilisation) sans altération de la matière organique.

**EBR (Efficacité Biologique Relative)**

Mesure qui permet de comparer l'effet biologique de deux rayonnements. Pour la caractériser, on prend une référence : le rayonnement X pour un transfert linéique (TLE) de  $3 \text{ keV}/\mu\text{m}$ .

**Echange labile**

Processus par lequel l'hydrogène lié à des atomes de soufre, d'oxygène ou d'azote par des liaisons covalentes se met en équilibre isotopique avec les autres hydrogènes labiles ou échangeables de l'environnement proche.

### **Ecosystème\***

Unité écologique de base en laquelle peuvent se réduire les systèmes écologiques plus complexes. La notion d'écosystème est un concept clef en écologie. Elle concerne en effet l'unité structurale et fonctionnelle en laquelle on peut subdiviser la biosphère toute entière, et *a fortiori* les ensembles hétérogènes d'un degré de complexité inférieur qu'elle renferme : « régions », « biomes » ou « paysages » par exemple.

### **Ecotoxicologie\***

Discipline dont l'objet est l'étude des polluants dans les écosystèmes. L'écotoxicologie comporte un aspect descriptif qui consiste en l'analyse de la circulation des polluants entre les biotopes et les communautés vivantes.

### **Electrolyse**

Méthode qui permet de réaliser des réactions chimiques grâce à une activation électrique.

### **Emissaire**

Emissaire est utilisé dans ce mémoire pour désigner un point émettant dans l'atmosphère l'ensemble des émissions tritiées d'une installation.

### **Enrubannage**

Procédé de stockage de fourrages en balles cylindriques, enroulées dans un ruban de matière plastique. Par extension, ce terme désigne également le fourrage stocké par cette méthode.

### **Ensilage**

Procédé de conservation de végétaux frais utilisant la fermentation lactique et consistant à les placer dans un silo ou à les mettre en tas et à les presser après les avoir hachés. Par extension, ce terme s'emploie également au produit de cette méthode qui est destiné à l'alimentation du bétail.

### **Evapotranspiration\***

Phénomène d'évaporation de l'eau par les végétaux terrestres par lequel la sève circule dans les plantes vasculaires. En un lieu donné, si P représente les précipitations annuelles et  $ET_p$  l'évapotranspiration, l'eau disponible  $E_d$  sera liée par la relation :

$$E_d = P - ET_p$$

### **Exposition (ou irradiation) externe ou interne**

L'exposition (ou irradiation) externe ou interne résulte de sources de rayonnements situées respectivement à l'extérieur ou à l'intérieur de l'organisme suite à l'ingestion ou l'inhalation de ces produits.

### **Exposition aigüe**

Exposition de courte durée : de quelques secondes à quelques jours.

### **Exposition chronique**

---

\* Définitions extraites du Dictionnaire Encyclopédique de l'Ecologie et des Sciences de l'Environnement, F. Ramade, Ediscience International, Paris, 1993, 822 p.

Exposition persistante, continue ou discontinue, se produisant sur une longue période (ayant lieu sur une période comprise entre plusieurs années à la vie entière).

**Feuillet  $\beta$** 

Un des principaux types de structure secondaire en accordéon d'une chaîne polypeptidique, chaque segment de la chaîne constitutif de ce feuillet étant orienté en sens opposé à celui des segments adjacents. La structure est rendue rigide par des liaisons hydrogène entre les segments voisins. Les feuillets sont présents dans la plupart des protéines globulaires.

**Formes isomériques**

Formes d'un composé chimique ayant la même formule brute mais des formules développées différentes.

**Fractionnement isotopique**

Modification, naturelle ou artificielle, du rapport isotopique d'un élément au cours du temps ou de processus.

**Gray (Gy)**

Unité de radiobiologie du système international permettant de mesurer la quantité de rayonnements absorbés – ou dose absorbée – par un organisme ou un objet exposé aux rayonnements.

1 Gray = 1 Joule par kilogramme de matière irradiée.

**Hélice  $\alpha$** 

Un des principaux types de structure secondaires constituant la structure générale des protéines. Elle est formée par l'enroulement régulier d'une chaîne polypeptidique sur elle-même. La stabilité de cette structure est due à deux facteurs : la présence de liaisons hydrogène parallèles à l'axe de l'hélice entre CO et NH de la liaison peptidique des résidus  $n$  et  $n+4$ , et au fait que les radicaux sont orientés vers l'extérieur, ce qui minimise les gênes stériques.

**Hétéroatome**

Atome d'un élément autre que le carbone ou l'hydrogène dans un composé organique.

**Histidine**

Un des 20 acides- $\alpha$ -aminés naturels constituant les protéines. Sa formule brute est  $C_6H_9N_3O_2$ . C'est un acide aminé essentiel pour l'homme.

**HTO**

Formule de l'eau tritiée, dans laquelle un atome de tritium a remplacé un atome de protium.

**Hydrogénation**

Fixation d'hydrogène sur un corps simple ou composé.

### **Hydrogène enfoui/tritium enfoui**

Terme désignant des atomes d'hydrogène (ou de tritium) liés à des biomolécules par des hétéroatomes et qui devraient donc être aptes à se mettre en équilibre isotopique avec les autres hydrogène labiles. Cependant, du fait de l'encombrement stérique ou de la conformation moléculaire, cet échange n'est pas possible.

### **Hydrolyse**

Décomposition d'une substance par l'eau grâce à l'action des ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  et  $\text{HO}^-$ .

### **Hydrophobe**

Se dit d'un composé qui repousse l'eau ou qui est repoussé par l'eau.

### **IAEA**

Voir AIEA.

### **ICRP**

Voir CIPR.

### **Inflorescence**

Disposition des fleurs sur la tige d'une plante.

### **Insaponifiable**

Se dit d'une matière liposoluble qui ne s'hydrolyse pas sous l'influence des alcalins, des acides ou des enzymes.

### **Ionisation**

Processus au terme duquel un atome ou une molécule neutre devient porteur d'une charge électrique positive ou négative.

### **Isomère**

Se dit de deux composés chimiques formés d'éléments dans les mêmes proportions, mais présentant des propriétés différentes. Des composés sont isomères s'ils ont la même formule brute mais des formules développées différentes.

### **Isomérisque**

Relatif aux isomères.

### **Isotope**

Ce mot vient du grec signifiant " placé au même endroit ".

Le mot isotope qualifie donc des atomes " placés au même endroit " dans la classification des éléments chimiques. Ces atomes ont le même nombre de protons (particules du noyau à charge électrique positive) donc le même numéro atomique mais une masse atomique différente. La plupart des quelques 100 éléments que distingue la classification, et constituent toute la matière de l'univers, possèdent plusieurs isotopes ; l'uranium 235 et l'uranium 238 par exemple sont les deux principaux isotopes présents dans l'uranium naturel. Le comportement

chimique ne diffère pas entre des isotopes qui ne peuvent être distingués entre eux que par de légères différences dans leurs propriétés physiques.

### **ITER (International Thermonuclear Experimental Reactor)**

Projet international (association de 34 pays) visant à démontrer la faisabilité d'un réacteur nucléaire utilisant le principe de la fusion nucléaire. Le site d'étude est localisé à proximité du site du CEA Cadarache.

### **Lactose\***

Diholoside (sucre composé de deux oses, sucres simples non hydrolysables) propre au lait des mammifères

### **Leucine**

Un des 20 acides- $\alpha$ -aminés naturels constituant les protéines. Sa formule brute est  $C_6H_{13}NO_2$ . C'est un acide aminé essentiel pour l'homme.

### **Liaison covalente**

Liaison chimique dans laquelle chacun des atomes liés met en commun un électron d'une de ses couches externes afin de former un doublet d'électrons liant les deux atomes.

### **Lixiviation**

Mobilisation de produits solubles par un solvant. On l'évoque notamment dans la situation mettant en œuvre de l'eau circulant dans un sol ou dans un autre substrat.

### **LMSE (Laboratoire de Métrologie et de la Surveillance de l'Environnement)**

Unité du Service de Protection contre les Rayonnements du CEA Valduc.

### **Lyophilisation**

Extraction de l'eau d'un produit préalablement surgelé par sublimation.

### **Lysine**

Un des 20 acides- $\alpha$ -aminés naturels constituant les protéines. Sa formule brute est  $C_6H_{14}N_2O_2$ . C'est un acide aminé essentiel pour l'homme.

### **Maïs ensilé**

Maïs moissonné à maturité et broyé afin d'être stocké dans un silo ou en tas afin que la fermentation lactique permette sa conservation jusqu'à l'alimentation des cheptels.

### **Marquage**

Présence en faible concentration dans un milieu naturel (eau, sol, sédiment, végétation, etc.) d'une substance dont l'impact est négligeable ou dont la nocivité n'est pas démontrée.

---

\* Définitions extraites du Dictionnaire Encyclopédique de l'Ecologie et des Sciences de l'Environnement, F. Ramade, Ediscience International, Paris, 1993, 822 p.

**Matière grasse**

Composant naturel des aliments majoritairement composés de triglycérides. Les autres composants forment l'insaponifiable.

**Mésophylle**

Partie interne d'une feuille constituée de parenchyme chlorophyllien. Il est criblé de nombreux espaces intercellulaires, les chambres sous-stomatiques, formant un réseau qui permet la circulation des gaz et les échanges avec l'air ambiant par l'intermédiaire des stomates.

**Métabolique**

Relatif au métabolisme.

**Métabolisme\***

Phénomène physiologique qui contrôle le flux de l'énergie et le cycle de la matière chez un organisme.

**Métabolite\***

Substance produite par le métabolisme.

**Miscible**

Que l'on peut mêler à un autre corps pour former un tout homogène.

**Monogastrique**

Se dit d'un animal ayant une seule poche gastrique, par opposition aux ruminants, qui en ont quatre.

**Mutagénicité\***

Propriété qu'ont certaines substances chimiques ou certains rayonnements d'être mutagènes, c'est-à-dire susceptibles de provoquer des mutations.

**NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate)**

Coenzyme d'oxydoréduction principalement produite lors de la phase oxydative de la voie des pentoses phosphate. Elle est la source principale d'électrons utilisés dans les réactions biosynthétiques dans la cellule.

**OBT (Organically Bound Tritium)**

Voir TOL.

---

\* Définitions extraites du Dictionnaire Encyclopédique de l'Ecologie et des Sciences de l'Environnement, F. Ramade, Ediscience International, Paris, 1993, 822 p.

**Oxydation\***

Réaction chimique se traduisant par la perte d'un électron par un composé donné. La combinaison d'une substance avec l'oxygène ou encore le prélèvement d'hydrogène à un composé en sont des exemples.

**Peptide**

Molécule organique constituée d'au moins deux acides aminés.

**Peptidique**

Relatif à un peptide.

**Période radioactive**

Au fur et à mesure que les atomes se désintègrent, l'activité d'une matière radioactive diminue : il y a décroissance radioactive. Le temps au bout duquel la moitié des atomes radioactifs initialement présents a disparu s'appelle la période radioactive. Selon les noyaux radioactifs concernés, cette période est très variable, allant de quelques secondes à plusieurs milliards d'années.

**pH (potentiel hydrogène)**

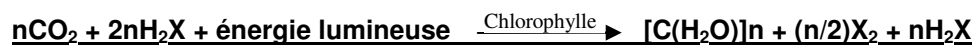
Il s'agit d'un paramètre de caractérisation d'une solution, permettant de déterminer le caractère acide, neutre ou basique de la solution.

**Phospholipides**

Lipide contenant de l'acide phosphorique.

**Photosynthèse\***

Phénomène dont l'importance écologique est capitale. La photosynthèse est l'agent de la production primaire de la biosphère et est aussi à l'origine de l'oxygène dans l'atmosphère terrestre. La photosynthèse s'effectue chez les végétaux autotrophes à l'intérieur des chloroplastes dont certaines structures membranaires renferment les molécules de chlorophylle. Celle-ci capte une partie de l'énergie solaire pour la transformer en énergie biochimique au travers des réactions photosynthétiques. La réaction générale de la photosynthèse peut s'écrire :



où X est l'oxygène de façon quasi-systématique dans la biosphère actuelle mais peut aussi être le soufre.

**Photosynthétique**

Qui se rapporte à la photosynthèse.

**Photosynthétisé**

Qui est produit par la photosynthèse.

---

\* Définitions extraites du Dictionnaire Encyclopédique de l'Ecologie et des Sciences de l'Environnement, F. Ramade, Ediscience International, Paris, 1993, 822 p.

### **Piézomètre**

Système qui permet d'accéder depuis la surface à l'eau d'une nappe phréatique. Il permet d'en relever le niveau piézométrique à l'aide d'une sonde (poids ou contacteur électrique). Le niveau piézométrique est l'altitude ou la profondeur par rapport à la surface du sol de l'interface entre la zone saturée et la zone non saturée dans une formation aquifère.

### **pK<sub>a</sub>**

Indication de la constante d'acidité d'un équilibre acido-basique.

### **Polymère**

Substance composée de molécules caractérisée par la répétition, un grand nombre de fois, d'un ou de plusieurs atomes ou groupes d'atomes.

### **Proline**

Un des 20 acides- $\alpha$ -aminés naturels constituant les protéines. Sa formule brute est  $C_6H_9N_3O_2$ . C'est un acide aminé essentiel pour l'homme.

### **Protéines sériques**

Protéine contenue dans le sérum.

### **Protium**

Isotope de l'hydrogène dont le noyau ne contient qu'un proton (hydrogène 1).

### **Radiations ionisantes/ rayonnements ionisants**

On dit qu'un rayonnement est ionisant quand il possède l'énergie nécessaire pour arracher un ou plusieurs électrons aux atomes ou aux molécules du milieu irradié. C'est le cas des rayonnements  $\alpha$  et  $\beta$ , mais aussi des rayonnements électromagnétiques que sont les rayonnements  $\gamma$ , les rayons X et certains ultra-violets. Les lumières visibles ou infrarouges ne le sont pas, ni les micro-ondes ou les ondes radio.

### **Radioactivité / radioactif**

Propriété de certains éléments chimiques dont les noyaux se désintègrent spontanément pour former d'autres éléments en émettant des rayonnements ionisants.

### **Radioécologie**

Discipline de la radiobiologie qui a pour objet l'étude de l'effet des rayonnements ionisants sur les systèmes écologiques. Un domaine de la radioécologie concerne l'étude de la pollution de l'environnement par les radionucléides produits par l'industrie nucléaire et de ses éventuelles conséquences écologiques. On évoque la bioaccumulation et la bioamplification des radionucléides dans les réseaux trophiques terrestres et aquatiques, en particulier ceux qui concernent les chaînes alimentaires de l'homme.

### **Radioélément**

Élément chimique radioactif, naturel ou artificiel.



**Radionucléide**

Se dit de tous les isotopes radioactifs d'un atome.

**Radioprotection**

Terme utilisé pour désigner la branche de la physique nucléaire qui concerne la protection des personnes contre les rayonnements ionisants. Par extension, le terme « radioprotection » regroupe l'ensemble des mesures destinées à réaliser la protection sanitaire de la population et des travailleurs contre ces rayonnements et à assurer le respect des dispositions légales.

**RAS (Relative Specific Activity)**

Ratio entre l'activité volumique tritium de l'eau de combustion de la matière sèche d'un échantillon et celle d'une eau, qu'elle soit l'eau extraite de l'échantillon ou de l'eau d'un compartiment environnemental au moment du prélèvement de l'échantillon.

**Rayonnement ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , ou X)**

Les rayonnements peuvent être constitués :

- par des particules chargées électriquement : les rayonnements  $\beta$  (beta),
- par des particules sans charge électrique : les neutrons,
- par des photons, comme la lumière : les rayonnements X et  $\gamma$  (gamma),
- par des noyaux d'hélium : les rayonnements  $\alpha$  (alpha).

**RBE (Relative Biological Effectiveness)**

Voir EBR.

**Rémanence**

Persistance d'un état après la disparition de sa cause.

**Rinçage isotopique**

Etape du traitement des échantillons préalablement à la mesure du TOLne qui consiste en la mise en contact de la matière sèche de l'échantillon avec de l'eau non-tritié, soit par diffusion de vapeur dans la matière sèche pulvérisée, soit par mise en suspension de la matière sèche dans de l'eau liquide pendant une période d'au moins 24 h. Une fois l'échange labile considéré complet, on extrait l'eau de la matière sèche traitée.

**Rumen**

Partie antérieure de l'estomac de certains mammifères dans laquelle s'effectue une digestion de la cellulose grâce à la présence de ciliés symbiotiques capables de l'hydrolyser.

**SAR**

Voir RAS.

**Sérine**

Un des 20 acides- $\alpha$ -aminés naturels constituant les protéines. Sa formule brute est  $C_6H_9N_3O_2$ . C'est un acide aminé essentiel pour l'homme.

**Serum**

Partie liquide d'un fluide biologique (sang, lait) débarrassée des éléments (substances, cellules ou organites) en suspension.

**Silique**

Fruit déhiscent, typique des crucifères, formé de deux valves allongées abritant une membrane médiane qui porte des graines sur les bords.

**Solution aqueuse**

Phase liquide contenant plusieurs espèces chimiques, dont une ultramajoritaire, l'eau qui est le solvant, et d'autres ultraminoritaires, les solutés ou espèces chimiques dissoutes.

**Spéciation**

La spéciation chimique d'un élément est la distinction entre les différentes formes de liaisons possibles de cet élément dans un environnement donné.

**Spectrometrie de masse**

Technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge.

**Stomate<sup>\*</sup>**

Organe végétal s'ouvrant à la face inférieure des feuilles permettant les échanges gazeux de ces dernières avec l'air.

**Sublimation**

Passage d'un corps de l'état solide à l'état gazeux.

**TEL (Transport d'Energie Linéique)**

Quantité qui décrit l'énergie transférée par une particule ionisante traversant la matière par unité de distance. Il varie selon la nature et l'énergie du rayonnement ionisant.

**TFWT (Tissue Free Water Tritium)**

Tritium présent dans une matrice biologique sous forme d'eau tritiée, qu'elle soit libre ou liée.

**Thymidine**

Désoxyribonucléoside spécifique à l'ADN.

---

<sup>\*</sup> Définitions extraites du Dictionnaire Encyclopédique de l'Ecologie et des Sciences de l'Environnement, F. Ramade, Ediscience International, Paris, 1993, 822 p.

**Thymine**

Un des 20 acides- $\alpha$ -aminés naturels constituant les protéines. Sa formule brute est  $C_6H_9N_3O_2$ . C'est un acide aminé essentiel pour l'homme.

**T<sub>ne</sub>/H<sub>ne</sub>**

Rapport isotopique entre le tritium et l'hydrogène de la fraction non-échangeable d'une matrice biologique.

**TOL (Tritium Organiquement Lié)**

Fraction de tritium d'une matrice biologique présente dans la matière sèche, liée par liaison covalente aux molécules organiques.

**Tourteau**

Résidu solide riche en protéines, obtenu lors du traitement des graines et des fruits oléagineux en vue de l'extraction d'huile. Il est très utilisé dans l'alimentation du bétail.

**Transfert d'énergie linéique**

Voir TEL.

**Transmutation**

Transformation d'un noyau atomique en un autre.

**Tricarbotrimètre**

Appareil utilisé pour mesurer l'activité volumique d'un échantillon par scintillation liquide.

**TWT**

Voir TFWT.

**Tyrosine**

Un des 20 acides- $\alpha$ -aminés naturels constituant les protéines. Sa formule brute est  $C_9H_{11}NO_3$ .

**Ubiquiste**

Qui est capable d'ubiquité.

**Ubiquité**

Fait de pouvoir être présent partout.

**Uridine**

Nucléoside spécifique à l'ARN.

**Vaisseaux lymphatiques**

Structure valvulée à parois minces qui transporte la lymphe, liquide biologique de composition analogue au plasma sanguin, dont elle n'est qu'un filtrat. Elle contient des globules blancs, notamment des lymphocytes.





# Bibliographie

AFNOR (1997). Energie Nucléaire - Mesure de la radioactivité dans l'environnement - Bioindicateurs. In Partie 4 : Guide général pour la préparation des échantillons.

AFNOR (2000). Energie Nucléaire - Mesure de la radioactivité dans l'environnement - Bioindicateurs. In Partie 5 : Guide général pour l'échantillonnage d'indicateurs biologiques du milieu terrestre.

AFNOR (2001a). Energie Nucléaire - Mesure de la radioactivité dans l'environnement - Bioindicateurs. In Partie 2 : Guide général sur les techniques d'échantillonnage.

AFNOR (2001b). Energie Nucléaire - Mesure de la radioactivité dans l'environnement - Bioindicateurs. In Partie 1 : Guide général pour l'établissement d'un programme d'échantillonnage.

AFNOR (2001c). Energie Nucléaire - Mesure de la radioactivité dans l'environnement - Bioindicateurs. In Partie 0 : Principes généraux.

AFNOR (2004). Qualité de l'eau - Echantillonnage. In Partie 3 : Lignes directrices pour la conservation et la manipulation des échantillons d'eau.

AFNOR (2007). Qualité de l'eau - Echantillonnage. In Partie 1 : Lignes directrices pour la conception des programmes et des techniques d'échantillonnages.

AFNOR (2008). Qualité de l'eau - Guide de prélèvement pour le suivi de la qualité des eaux dans l'environnement. In Partie 1 : Prélèvement d'eau superficielle.

AFNOR (2009). Qualité de l'eau - Guide de prélèvement pour le suivi de la qualité des eaux dans l'environnement. In Partie 3 : Prélèvement d'eau souterraine.

AFNOR (2011). Qualité de l'eau-Détermination de l'activité volumique du tritium. In Méthode par comptage des scintillations en milieu liquide.

Agricultural Research Service. US Department of Agriculture (2012). USDA National Nutrient Database for Standard Reference - Release 25.

Amano H., Atarashi M., Noguchi H., Ichimasa Y., Ichimasa M. (1995), Formation of organically bound tritium in plants during the 1994 chronic HT release experiment at Chalk River. *Fusion technology*, **28**, pp. 803-808.

ANC (2001). Apports nutritionnels conseillés. Tec et Doc. Lavoisier, Paris

Arai K., Takeda H., Iwakura T. (1985). Studies of the tritium uptake in some edible plants and transfer to the rat. pp. 35-49. National Institute of Radiological Sciences, Chiba-shi.

Atarashi-Andoh M., Amano H., Ichimasa M., Ichimasa Y. (2002), Conversion rate of HTO to OBT in plants. *Fusion science and technology*, **48**, pp. 771-774.

Audette-Stuart M., Yankovitch T. (2011), Bystander effects in bullfrog tadpoles. *Radioprotection*, **46**, pp. S497-S502.

Bacchetta A., Baglan N., Aupiais J. (2012). Tritium organiquement lié (TOL) : analyse et compréhension. *XIII<sup>èmes</sup> Journées nationales de radiochimie et chimie nucléaire*, Nantes, pp.

Baglan N., Alanic G., Le Meignen R., Pointurier F. (2011), A follow up of the decrease of non exchangeable organically bound tritium levels in the surroundings of a nuclear research center. *Journal of Environmental Radioactivity*, **102**, pp. 695-702.

Baglan N., Alanic G., Pointurier F. (2005), Tritium determination at trace level: which strategy to determine accurately HTO and OBT in environmental samples? *Fusion science and technology*, **48**, pp. 749-754.

Baglan N., Ansoborlo E. (2010). Métrologie du tritium : cas du tritium organiquement lié. *In: Livre Blanc Tritium. ASN ed.*, Paris, pp.

Baglan N., Ansoborlo E., Cossonnet C., Fouhal L., Deniau I., Mokili M., Henry A., Fourré E., Olivier A. (2010), Métrologie du tritium dans différentes matrices : cas du tritium organiquement lié. *Radioprotection*, **45**, 3, pp. 369-390.

Baglan N., Le Meignen R., Alanic G., Pointurier F. (2008), Determination of the non exchangeable-organically bound tritium (ne-OBT) fraction in tree leaf samples collected around a nuclear research center. *Fusion science and technology*, **54**, pp. 243-247.

Balonov M., Dolgirev E., Likhtarev I. (1974), Exchange kinetics and dosimetry of tritium oxide in man for different routes of administration. *Health physics*, **27**, pp. 367-375



Balonov M. I., Muksinova K. N., Mushkacheva G. S. (1993), Tritium radiobiological effects in mammals: review of experiments of the last decade in Russia. *Health physics*, **65**, pp. 713-726.

Barbey P., Boilley D. (2010). Le tritium : un risque sous-estimé. *In*: Livre Blanc du Tritium. ASN, Paris, pp. 268-271.

Bariac T., Biron P., Cayet S., Doussan C., Joffre R., Marloie O., Najjar G., Richard P., Rambal S., Sanchez-Perez J. M. (2000). Biogéochimie isotopique des interactions biosphère-atmosphère. *Programme National de Recherche en Hydrologie*, Toulouse, pp. 255-259.

Baumgärtner F., Donhaerl W. (2004), Non-exchangeable organically bound tritium (OBT) : its real nature. *Anal Bioanal Chem*, **379**, pp. 204-209.

Baumgärtner F., Kim M. A. (1990), Isotope effects in the equilibrium and non-equilibrium vaporization of tritiated water and ice. *Applied Radiation and Isotopes*, **41**, pp. 395-399.

Baumgärtner F., Kim M. A. (2000), Tritium/Protium fractionation near and inside DNA. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, **243**, pp. 295-298.

Baumgärtner F., Yankovich T., Kim S. B. (2009), Logistic analysis of OBT dynamics. *Health physics*, **97**, pp. 572-590.

Belot Y. (1986), Tritium in plants : a review. *Radiation Protection Dosimetry*, **16**, pp. 101-105.

Belot Y., Gauthier D., Camus H., Caput C. (1979), Prediction of the flux of tritiated water from air to plant leaves. *Health physics*, **37**, pp. 575-583.

Belot Y., Guénot J., Caput C. (1988), Emission to atmosphere of tritiated water formed at soil surface by oxidation of HT. *Fusion technology*, **14**, pp. 1231-1234.

Belot Y., Roy M., Métivier H. (1996). Le Tritium de l'Environnement à l'Homme. Institut de Protection et de Sécurité Nucléaire.

Belovodski L. F., Gaevoi V. K., Grichmanovski V. I. (1985). Tritium. In Moscow Energoatomizdat.

Biron P., Bariac T. (2002). Origine de l'eau dans le continuum Sol-Plante-Atmosphère : apport de la biogéochimie isotopique. *Flux d'eau dans la plante*, Lusignan, pp. 13-21.

Bogen D. C., Henkel C. A., White C. G. C., Welford G. A. (1973), A method for the determination of tritium distribution in environmental and biological samples. *Journal of Radioanalytical Chemistry*, **13**, pp. 335-341.

Bourlat Y., Taillade J., Baglan N., Allanic G., Pointurier F. (2010), Reconstitution des rejets gazeux en tritium des installations du centre CEA de Saclay à partir des cernes de deux arbres de plus de 50 ans. *Contrôle*, **188**, pp. 24-28.

Boutonnier J.-L. (2006) Matière grasse laitière - Composition, organisation et propriétés. In *Techniques de l'Ingénieur*, pp. F 6 320-1 -F 6 320-15. Techniques de l'Ingénieur, Paris.

Boyer C. (2009). Etude des transferts du tritium atmosphérique chez la laitue : étude cinétique, état d'équilibre et intégration du tritium sous forme organique lors d'une exposition atmosphérique continue, Université de Franche-Comté, Besançon, 312p.

Boyer C., Guétat P., Fromm M., Vichot L., Losset Y., Tatin-Froux F., Mavon C., Badot P. M. (2010). Etude du transfert du tritium aux végétaux. *In*: Livre Blanc Tritium. pp. 211-214.

Boyer C., Vichot L., Boissieux T., Losset Y., Mavon C., Tatin-Froux F., Fromm M., Badot P. M. (2009a), Variations of conversion rate from Tissue Free Water Tritium to Organically-Bound Tritium in lettuces continuously exposed to atmospheric HT and HTO. *Radioprotection*, **44**, pp. 671-676.

Boyer C., Vichot L., Fromm M., Losset Y., Tatin-Froux F., Guétat P., Badot P. M. (2009b), Tritium in plants: a review of current knowledge. *Environmental and experimental botany*, **67**, pp. 34-51.

Brudenell A., Collins C., Shaw G. (1997), Dynamics of tritiated water (HTO) uptake and loss by crops after short-term atmospheric release. *J. Environ. Radioactivity*, **36**, pp. 197-218.

Campbell N. A. (1995). Le transport des nutriments chez les végétaux. *In*: *Biologie. Université D. B. ed.*, pp. 699-717.

Carr T. E. F., Nolan J. (1979), Testis mass loss in the mouse induced by tritiated thymidine, tritiated water, and <sup>60</sup>Co gamma irradiation. *Health physics*, **36**, 2, pp. 135-145.

Carsten A. (1979), Tritium in the Environment. *Advances in Radiation Biology*, **8**, pp. 419-458.

Caussade B. (2010). Modélisation du transport de tritium dans l'environnement. *In: Le Tritium - Actualité d'aujourd'hui et de demain. Gazal S., Amiard J. C. eds., Tec&Doc, Paris*, pp. 77-95.

Cawley C. N., Lewis B. A., Cannon L. A. (1985), Possible parameters in the urinary excretion of tritium. *Trans. Am. Nucl. Soc.*, **50**, pp.

Cayot P., Denis L. (1998). Structures et Technofonctions des protéines du lait. Tec&Doc, Paris, 211 p.

CCSN (2009). Etude sur le devenir environnemental du tritium dans l'atmosphère. Ottawa.

CCSN (2010). Le tritium : effets sur la santé, dosimétrie et radioprotection. Commission canadienne de sûreté nucléaire, 240 p.

CEA (2013). 2012 - Bilan maîtrise des risques. Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives.

Choi Y. H., Lim K. M., Lee W. Y., Diabaté S., Strack S. (2002), Tissue free water tritium and organically bound tritium in the rice plant acutely exposed to atmospheric HTO vapor under semi-outdoor conditions. *Journal of Environmental Radioactivity*, **58**, pp. 67-85.

Chopra C., Heddle J. A. (1988). Cytogenetic measurements of the relative biological effectiveness of tritium. Atomic Energy Control Board, Ottawa, ON (Canada).

Cline J. F. (1953), Absorption and metabolism of tritium oxide and tritium gas by bean plants. *Plant Physiology*, **28**, pp. 712-723.

Collège de l'ASN (2010). Position de l'ASN. *In: Livre Blanc Tritium*. pp.

Collège des enseignants de la Nutrition (1994). Enseignement de la Nutrition. 173 p.

Commerford S., Carsten A., E. C. (1977), The distribution of tritium in the glycogen, hemoglobin, and chromatin of mice receiving tritium in their drinking water. *Radiation research*, **72**, pp. 333-342.

Commerford S., Carsten A., E. C. (1983), The distribution of tritium among the amino acids of proteins obtained from mice exposed to tritiated water. *Radiation research*, **94**, pp. 151-155.

Comte A. (2005). Tritium, Fiche radiotoxicologique. pp. 10 p. CEA Carmin.

Cortés F., Dominguez I., Mateos S., Pinero J., Mateos J. C. (1990), Evidence for an adaptative response to radiation damage in plant cells conditioned with X-rays or incorporated tritium. *Int. J. Radiat. Biol.*, **57**, pp. 537-541.

Cortès P., Elbez-Uzan J., Glugla M. (2009). Optimisation de la gestion du tritium dans le projet ITER. *Journées tritium*, Paris, pp.

Cossonnet C., Neiva Marques A. M., Gurriaran R. (2009), Experience acquired on environmental sample combustion for organically bound tritium measurement. *Applied Radiation and Isotopes*, **67**, 5, pp. 809-811.

CRC (2008). Handbook of Chemistry and Physics - 89th edition - 2008-2009. CRC Press, 2736 p.

Culebras J. M., Moore F. D. (1977), Total body and the exchangeable hydrogen. I. Theoretical calculation of nonaqueous exchangeable hydrogen in man. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **232**, pp. R54-R59.

D'Hour P., Coulon J. B. (1994), Variations de la production et de la composition du lait au pâturage en fonction des conditions climatiques. *Ann. Zootch.*, **43**, pp. 105-109.

Davis P. (1997), Tritium transfer parameters for the winter environment. *Journal of Environmental Radioactivity*, **36**, 2-3, pp. 177-196.

Davis P. A., Kim S. B., Chouhan S. L., Workman W. J. G. (2005), Observed and modeled tritium concentrations in the terrestrial food chain near a continuous atmospheric source. *Fusion science and technology*, **48**, pp. 504-507.

Decaen C., Journet M. (1966), Influence saisonnière sur la production et la composition du lait. *Ann. Zootch.*, **15**, 3, pp. 259-277.

Diabaté S., Strack S. (1993). Organically bound tritium. In Health physics, Vol. 65, pp. 698-712.

- Diabaté S., Strack S. (1997), Organically Bound Tritium in wheat after short-term exposure to atmospheric tritium under laboratory conditions. *Journal of environmental radioactivity*, **36**, pp. 157-175.
- Division de la Recherche sur le Nutrition (2010). Fichier Canadien sur les Elements Nutritifs. Direction Générale des Produits de Santé et des Aliments - Santé Canada.
- Dobson R. L., Kwan T. C. (1976), The RBE of tritium radiation measured in mouse oocytes: increase at low exposure levels. *Radiation research*, **66**, pp. 615-625.
- Dogaru M., Calin M. A., Stan-Sion C. (2011), Tritium measurements by AMS and applications. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, **288**, pp. 491-498.
- Dunstall T. G., Ogram G. L., Spencer F. S. (1985), Elemental tritium deposition and conversion in the terrestrial environment. *Fusion technology*, **8**, pp. 2551-2556.
- Dupont F., Altenbach S. (2003), Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *Journal of Cereal Science*, **38**, 2, pp. 133-146.
- Edwards T. W. D., Fritz P. (1986), Assessing meteoritic water composition and relative humidity from  $^{18}\text{O}$  and  $^2\text{H}$  in wood cellulose: paloclimatic implications for southern Ontario, Canada. *Applied Geochemistry*, **1**, pp. 715-723.
- Ellet W. H., Braby L. A. (1972), The microdosimetry of 250 kVp and 65 kVp X-rays,  $^{60}\text{Co}$  gamma rays, and tritium beta particles. *Radiation research*, **51**, pp. 229-243.
- Elwood J. (1971), Ecological aspects of tritium behavior in the Environment. *Nuclear safety*, **12**, pp. 326-337.
- Environment Agency (2005). Guidance on the measurement of tritium in environmental samples - Methods for the examination of waters and associated materials. Environment Agency, Rothley, Leicestershire, UK.
- Etnier E. L., Travis C. C., Hetrick D. M. (1984), Metabolism of organically bound tritium in man. *Radiation research*, **100**, pp. 487-502.
- Farfan E. B., LaBone T. R., Staack G. C., Cheng Y. S., Zhou Y., Varallo T. P. (2012), Determination of in vitro lung solubility and Intake-to-Dose Conversion Factor for tritiated Lanthanum Nickel Aluminium Alloy. *Health physics*, **103**, 3, pp. 249-254.

Feinendegen L. E., Bond V. P. (1973). Transmutation versus Beta irradiation in the pathological effects of tritium decay. *In: Tritium. Moghissi A., Carter M. eds.,* Messenger Graphics, Phoenix AZ USA, pp.

Furuno-Fukushi I., Ueno A. M., Matsudaira H. (1987), Cell killing and mutation to 6-thioguanine resistance after exposure to tritiated amino acids and tritiated thymidine in cultured mammalian cells (L5178Y). *Radiation research*, **110**, pp. 428-438.

Galeriu D., Davis P., Raskob W., Melintescu A. (2008), Recent progresses in tritium radioecology and dosimetry. *Fusion science and technology*, **54**, pp. 237-242.

Galeriu D., Heling R., Melintescu A. (2005a), The dynamics of tritium -including OBT- in the aquatic food chain. *Fusion science and technology*, **48**, pp. 779-782.

Galeriu D., Melintescu A., Strack S., Atarashi-Andoh M., Kim S. B. (2013), An overview of organically bound tritium experiments in plants following a short atmospheric HTO exposure. *Journal of Environmental Radioactivity*, **118**, pp. 40-56.

Galeriu D., Melintescu A., Takeda H., Beresford N. (2006). An interdisciplinary approach for the transfer of tritium in animals and human dosimetry. *International Symposium on Environmental Modelling and Radioecology*, Rokkasho, Aomori, Japan, pp. 40-48.

Galeriu D., Takeda H., Melintescu A., Trivedi A. (2005b), Energy metabolism and human dosimetry of tritium. *Fusion science and technology*, **48**, pp. 795-798.

Garland J. A., Cox L. C. (1980), The absorption of tritium gaz by English soils, plants and the sea. *Water, air, and soil pollution*, **14**, pp. 103-114.

Gat J. R., Mook W. G., Meijer H. A. J. (2008). Chap. 5 : Tritium dans l'atmosphere. *In: Isotopes Environnementaux dans le Cycle Hydrogéologique : Principes et Applications. AIEA , UNESCO eds.,* Vienna, vol. 2, pp.

Gatti F. (2001), Microcalorimetric measurements. *Nuclear Physics B (Proc. Suppl.)*, **91**, pp. 293-296.

Genty C., Reversat G. (1973), Isotopic analysis of tritiated water. *Analytical chemistry*, **45**, 9, pp. 1710-1715.

Gerashchenko B. I., Howell R. W. (2003), Cell proximity is a prerequisite for the proliferative response of bystander cells co-cultured with cells irradiated with  $\gamma$ -rays. *Cytometry Part A*, **56A**, 2, pp. 71-80.

Gerashchenko B. I., Howell R. W. (2004), Proliferative response of bystander cells adjacent to cells with incorporated radioactivity. *Cytometry Part A*, **60A**, 2, pp. 155-164.

Gontier G., Siclet F. (2011), Le tritium organique dans les écosystèmes d'eau douce, évolution à long terme dans l'environnement des centres nucléaires de production d'électricité français. *Radioprotection*, **46**, 4, pp. 457-491.

Goodhead D. T. (2009), The relevance of dose for low-energy beta emitters. *Journal of radiological protection*, **29**, pp. 321-333.

Gragtmans N. J., Myers D. K., Johnson J. R., Jones A. R., Johnson L. D. (1984), Occurrence of mammary tumors in rats after exposure to tritium beta rays and 200 kVp X rays. *Radiation research*, **99**, 3, pp. 636-650.

Grosse A., Johnston W., Wolfgang R., Libby W. F. (1951), Tritium in nature. *Sciences*, **113**, pp. 1-2.

Guénot J. (1986). Comportement du tritium dans les végétaux supérieurs, INA-PG, 59p.

Guénot J., Belot Y. (1984), Assimilation of  $^3\text{H}$  in photosynthesizing leaves exposed to HTO. *Health physics*, **47**, pp. 849-855.

Guétat Ph. (2013), Key mechanisms for tritium transfer in the terrestrial environment. *Radioprotection*, **48**, 02, pp. 259-276

Guétat Ph., Armand P., Monfort M. (2004). Calcul d'impact radiologique d'un rejet par voie atmosphérique en situation normale - Formulaire du logiciel GASCON. CEA/DAM/DASE, Bruyères-le-Chatel.

Guétat Ph., Douche C., Hubinois J. C. (2008). Tritium and the environment: sources, measurement and transfer. *EU Scientific Seminar 2007 - Emerging issues on tritium and low energy beta emitters*, Luxembourg, pp. 59-72.

Guétat Ph., Le Goff P., Boyer C., Duda J. (2013), Apports de la surveillance du centre CEA-Valduc sur la connaissance des transferts de l'eau tritiée atmosphérique dans les différents compartiments de l'environnement. *Radioprotection*, **48**, 03, pp. 367-389

Gulden W., Raskob W. (1992), Accidental tritium doses based on realistic modelling. *Fusion technology*, **21**, pp. 536-543.

Hamill W. H. (1937), Micro analysis for exchangeable hydrogen. *Journal of American Chemical Society*, **59**, 6, pp. 1152-1153.

Hamill W. H., Freudenberg W. (1935), Quantitative isotopic exchange reaction in the carbohydrate group. *Journal of American Chemical Society*, **57**, 8, pp. 1427-1430.

Harrison J. (2009), Doses and risks from tritiated water and environmental bound tritium. *Journal of radiological protection*, **29**, pp. 335-349.

Harrison J., Khursheed A., Lambert B. (2002), Uncertainties in dose coefficients for intakes of tritiated water and organically bound forms of tritium by members of the public. *Radiation Protection Dosimetry*, **98**, 3, pp. 299-311.

Heling R., Galeriu D. (2002). Modification of LAKECO-B for H-3. NRG, Arnhem.

Hill R., Johnson J. (1993), Metabolism and dosimetry of tritium. *Health physics*, **65**, pp. 628-647.

Hisamatsu S., Hashimoto T., Takizawa Y. (1990), Further study of tritium concentration in some European foods. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, **146**, pp. 245-253.

Hopkins W. G. (1995). Introduction to Plant Physiology. John Wiley & Sons, Inc.p.

Horton J. H., Corey J. C., Wallace R. M. (1971), Tritium loss from water exposed to the atmosphere. *Environmental Science & Technology*, **5**, pp.

HPA (2007). Review of risks from tritium - Report of the independent advisory group on ionising radiation. Health Protection Agency, Didcot.

Hubert F. (2010). Caractéristiques et mesure du tritium. *In: Le Tritium - Actualité d'aujourd'hui et de demain. Gazal S., Amiard J. C. eds., Tec&Doc, Paris*, pp. 1-6.

IAEA (1981). Tritium in some typical ecosystems. In Technical reports series, Vienna.

IAEA (1989). Measurement of radionuclides in food and the environment - A guidebook. IAEA, Vienna, Austria.

IAEA (2003). Modelling the environmental transport of tritium in the vicinity of long term atmospheric and sub-surfaces sources. (IAEA, ed.), Vol. IAEA-BIOMASS-3. IAEA, Vienna.



IAEA (2007). Definition of Organically Bound Tritium (OBT). *In*: Tritium and C-14 Working Group, Environmental Modelling for Radiation Safety program. Vienna, Austria, pp.

IAEA (2009). Quantification of radionuclide transfer in terrestrial and freshwater environments for radiological assessments. IAEA, Vienna.

Ichimasa M., Ichimasa Y., Yagi Y., Ko R., Suzuki M., Akita Y. (1989), Oxidation of atmospheric molecular tritium in plant leaves, lichens and mosses. *Journal of Radiation Research*, **30**, 4, pp. 323-329.

ICRP (1976). Report on the task group on Reference Man. ICRP, New York.

ICRP (1979). Limits for intakes of radionuclides by workers. ICRP, New York.

ICRP (1989). Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides - Part 1. (56 N., ed.). International Commission on Radiobiological Protection, New York.

ICRP (1993). Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides - Part 2. (67 N., ed.). International Commission on Radiobiological Protection, New York.

ICRP (1994). Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection (HRTM). In ICRP Publications, Vol. 66.

ICRP (2003). Relative Biological Effectiveness (RBE), Quality Factor (Q), and Radiation Weighting Factor ( $w_R$ ). Pergamon Press, Oxfordp.

ICRP (2007). Draft Guidance Document on Interpretation of Bioassay Data - 21 February 2007. ICRP, New York.

Iida T., Yokomoyama S., Fukuda H., Ikebe Y. (1995), A simple passive method of collecting water vapour for environmental tritium monitoring. *Radiation Protection Dosimetry*, **58**, 1, pp. 23-27.

Ijiri K. (1989), Cell death (Apoptosis) in mouse intestine after continuous irradiation with  $\gamma$  rays and with  $\beta$  rays from tritiated water. *Radiation research*, **118**, 1, pp. 180-191.

Ikushima T., Aritomi H., Morisita J. (1996), Radioadaptive response: Efficient repair of radiation induced DNA damage in adapted cells. *Mutation research*, **358**, pp. 193-198.

INRS (2009). Tritium. Radioprotection : radionucléides. In ED 4303, pp. 10. INRS, Paris.

IRSN (2009). Eléments de réflexion sur le risque sanitaire posé par le tritium. 24 p.

IRSN/DEI (2010). Point de vue de l'IRSN sur les questions clés et sur les pistes de recherche et de développement - Le tritium dans l'environnement. *In: Livre Blanc Tritium. ASN ed.*, pp. 227-239.

ISO (2006). Water quality - Sampling. In Part 5: Guidance on sampling of drinking water from treatment works and piped distribution systems.

ISO (2009). Water quality - Sampling. In Part 11: Guidance on sampling of groundwaters.

Jacobs D. G. (1968). Sources of tritium and its behaviour upon release to the environment. (D-24635 T., ed.). U.S. Atomic Energy Commission/Division of Technical information, Oak Ridge, Tennessee.

Jancso G., Van Hook W. A. (1974), Condensed phase isotope effects (especially vapor pressure isotope effects). *Chem. Rev.*, **74**, pp. 689-750.

Jean-Baptiste P., Baumier D., Fourré E., Dapoigny A., Clavel B. (2007), The distribution of tritium in the terrestrial and aquatic environment of the Creys-Malville nuclear power plant (2002 - 2005). *Journal of Environmental Radioactivity*, **94**, pp. 107-118.

Jean-Baptiste P., Fourré E., Baumier D., Dapoigny A. (2009), Environmental OBT/TFWT ratios revisited. *Fusion science and technology*, **60**, pp. 1248-1251.

Jean-Baptiste P., Fourré E., Dapoigny A., Baumier D., Baglan N., Alanic G. (2010), <sup>3</sup>He mass spectrometry for very low-level measurement of organic tritium in environmental samples. *Journal of Environmental Radioactivity*, **101**, pp. 185-190.

Johnson J. R., Myers D. K., Jackson J. S., Dunford D. W., Gragtmans N. J., Wyatt H. M., Jones A. R., Percy D. H. (1995), Relative biological effectiveness of tritium for induction of myeloid leukemia in CBA/H mice. *Radiation research*, **144**, 1, pp. 82-89.

Kakiuchi M. (2000), Distribution of isotopic water molecules, H<sub>2</sub>O, HDO and D<sub>2</sub>O, in vapor and liquid phase in pure water and aqueous solution systems. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **64**, 9, pp. 1485-1492.

Kamiguchi Y., Tateno H., Mikamo K. (1990), Dose-response relationship for the induction of structural chromosome aberrations in human spermatozoa after in vitro exposure to  $\beta$ -rays. *Mutation research/Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, **228**, 2, pp. 125-131.

Kanazawa T., Kanazawa K., Bassham J. A. (1972), Tritium incorporation in the metabolism of *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Science & Technology*, **6**, pp. 638-642.

Katz J., Rognstad R., Kemp R. (1965), Isotope discrimination effects in the metabolism of tritiated glucose. *The journal of biochemistry*, **240**, pp. 1484-1486.

Khelil-Arfa H., Boudon A., Maxin G., Faverdin P. (2012), Prediction of water intake and excretion flows in Holstein dairy cows in thermoneutral conditions. *Animal*, **6**, 10, pp. 1662-1676.

Kim M. A., Baumgärtner F. (1991), Tritium fractionation in biological systems and in analytical procedures. *Radiochimica Acta*, **54**, pp. 121-128.

Kim M. A., Baumgärtner F. (1994), Equilibrium and non-equilibrium partition of tritium between organics and tissue water of different biological systems. *Applied Radiation and Isotopes*, **45**, pp. 353-360.

Kim M. A., Baumgärtner F. (1997), Tritium fractionation in anomalous water bound to environmental samples. *Journal of Environmental Radioactivity*, **36**, pp. 111-127.

Kim S. B., Chouhan S. L., Davis P. (2011), Observed and modeled tritium in the wetland ecosystem in duke swamp near a nuclear waste management area. *Fusion science and technology*, **60**, pp. 960-963.

Kim S. B., Korolevych V. Y. (2013), Quantification of exchangeable and non-exchangeable organically bound tritium (OBT) in vegetation. *Journal of Environmental Radioactivity*, **118**, pp. 9-14.

Kim S. B., Shultz C., Stuart M., McNamara E., Festarini A., Bureau D. P. (2013), Organically Bound Tritium (OBT) formation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): HTO and OBT-spiked food exposure experiments. *Applied Radiation and Isotopes*, **72**, pp. 114-122.

Kim S. B., Workman W. J. G., Davis P. (2008), Experimental investigation of buried tritium in plant and animal tissue. *Fusion science and technology*, **54**, pp. 257-260.

Kirchmann R., Charles P., Van Bruwaene R., Remy J., Koch G., Van den Hoek J. (1977), Distribution of tritium in the different organs of calves and pigs after ingestion of various tritiated feeds. *Current topics in radiation research quarterly*, **12**, pp. 291-312.

Kirchmann R., Lafontaine A., Van den Hoek J., Koch G. (1969), Transfert et répartition du tritium dans les constituants principaux du lait de vaches alimentées avec de l'eau contaminée. *Compte rendu de séance de la Société Belge de Biologie*, **163**, pp. 1459-1463.

Kirchmann R., Van den Hoek J. (1972), Le tritium dans la biosphère et son transfert dans la chaîne alimentaire. *Journal belge de radiologie*, **55**, 2, pp. 233-242.

Kirchmann R., Van den Hoek J., Lafontaine A. (1971), Transfert et incorporation du tritium dans les constituants de l'herbe et du lait, en conditions naturelles. *Health physics*, **21**, pp. 61-66.

Kistner G. N. (1969), Tritium excretion via cow's milk after continuous intake of tritiated water. *In: Tritium. Moghissi A. A. and Carter M. ed.*, Messenger Graphics Publisher, Phoenix, Las Vegas, USA, pp. 349-355.

Klinman J. P. (2006). Kinetic isotope effects in enzymology. *In: Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology. Meister A. ed.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, vol. 46, pp. 415-494.

Komatsu K., Higuchi M., Sakka M. (1981), Accumulation of tritium in aquatic organisms through a food chain with three trophic levels. *Journal of Radiation Research*, **22**, pp. 226-241.

Komatsu K., Okumura Y., Sakamoto K. (1990), Radiation dose to mouse liver cells from ingestion of tritiated food or water. *Health physics*, **58**, 5, pp. 625-629.

König L. A. (1990), Tritium in food chain. *Radiation Protection Dosimetry*, **30**, 2, pp. 77-86.

Koranda J. J., Martin J. R. (1972), The movement of tritium in ecological systems. *Nucl. Sci. Abstr.*, **26**, pp. 430-455.

Korolevych V. Y., Kim S. B. (2013), Relation between the tritium in continuous atmospheric release and the tritium contents of fruits and tubers. *Journal of Environmental Radioactivity*, **118**, pp. 113-120.

Kotzer T., Workman W. J. G. (1999). Measurements of tritium (HTO, TFWT, OBT) in environmental samples at varying distances from a nuclear generating station. pp. 29 p. AECL, Chalk River, Ontario, Canada.

Kozlowski R., Bouffler S. D., Haines J. W., Harrison J., Cox R. (2001), In utero haemopoietic sensitivity to alpha, beta, or X-irradiation in CBA/H mice. *International Journal of Radiation biology*, **77**, 7, pp. 805-815.

Lambert B., Clifton R. (1968). Radiation doses resulting from the ingestion of tritiated thymidine by the rat. *Health physics*, Vol. 15, pp. 3-9.

Le Dizès S. (2004). Modélisation du transfert de tritium issu de rejets atmosphériques dans les systèmes agricole et anthropique. IRSN, St Paul-Lez-Durance.

Le Dizès S. (2005). Test du module plante de Tocatta pour des rejets accidentels de tritium dans l'atmosphère - Inter-comparaison dans le cadre du scénario "Soybean" (EMRAS, AIEA). IRSN, St Paul-Lez-Durance.

Leaney F. W., Osmond C. B., Allison G. B., Ziegler H. (1985), Hydrogen-isotope composition of leaf water in C3 and C4 plants: its relationship to the hydrogen-isotope composition of dry matter. *Planta*, **164**, pp. 215-220.

Lebaron-Jacobs L., Renaud P. (2009). Tritium : Comportement dans l'environnement et effets potentiels sur l'Homme. In Congrès de la Société Française de Radioprotection, Angers, France.

Lide D. R. (2008). Handbook of Chemistry and Physics - 89th edition - 2008-2009. CRC Press, 2736 p.

Little M., Wakeford R. (2008), Systematic review of epidemiological studies of exposure to tritium. *Journal of radiological protection*, **28**, pp. 9-32.

Love H. H., Hunt J., Knezovich J. P. (2003), Reconstructing tritium exposure using tree rings at Lawrence Berkeley National Laboratory, California. *Environmental Science & Technology*, **37**, 19, pp. 4330-4335.

Lucas L. L., Unterweger M. P. (2000), Comprehensive review and critical evaluation of the half-time of tritium. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.*, **105**, pp. 541-549.

Luo Y., Sternberg L. (1991), Deuterium heterogeneity in starch and cellulose nitrate of CAM and C3 plants. *Phytochemistry*, **30**, pp. 1095-1098.

March P., Besnus F. (2010). Sources de production et gestion du tritium produit par des installations nucléaires. *In: Livre Blanc Tritium*. pp.

Mathieu M. G. (1942), De l'influence des facteurs climatiques sur la constante moléculaire simplifiée et corrigée du lait et sur les variations quantitatives et qualitatives de ses éléments principaux - Etude appliquée au lait de vache des plus hautes vallées alpines. *Lait*, **22**, 219-220, pp. 317-327.

Matsuda Y., Yamada T., Tobari I. (1986), Chromosome aberrations induced by tritiated water or  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays at early pronuclear stage in mouse eggs. *Mutation research*, **160**, 2, pp. 87-93.

McFarlane J. C. (1976), Tritium fractionation in plants. *Environmental and experimental botany*, **16**, pp. 9-14.

McFarlane J. C., Beckert W. F., Brown K. W. (1979), Tritium in plants. *J. Environ. Qual.*, **8**, pp. 269-276.

McFarlane J. C., Rogers R. D., Bradley D. V. (1978), Environmental tritium oxidation in surface soil. *Environmental Science & Technology*, **12**, 5, pp. 590-593.

Melintescu A., Galeriu D., Takeda H. (2007), Reassessment of tritium dose coefficients for the general public. *Radiation Protection Dosimetry*, **127**, pp. 153-157.

Mewissen D. J., Furedi M., Ugarte. A., Rust J. H. (1977), Comparative incorporation of tritium from tritiated water versus tritiated thymidine, uridine or leucine. *Radiation research*, **12**, pp. 225-254.

Moghissi A., Bretthauer E., Compton E. H. (1973), Separation of water from biological and environmental samples for tritium analysis. *Analytical chemistry*, **45**, 8, pp. 1365-1566.

Moghissi A., Carter M., Bretthauer E. (1972), Further studies on the long-term evaluation of the biological half-life of tritium. *Health physics*, **23**, pp. 805-806.

Moghissi A., Carter M., Lieberman R. (1971), Long-term evaluation of the biological half-life of tritium. *Health physics*, **21**, pp. 57-60.

Moiseenko V. V., Hamm R. N., Waker A. J., Prestwich W. V. (2001a), Calculation of radiation-induced DNA damage from photons and tritium beta-particles. *Radiation environ. biophys.*, **40**, pp. 23-31.

Moiseenko V. V., Waker A. J., Hamm R. N., Prestwich W. V. (2001b), Calculation of radiation-induced DNA damage from photons and tritium beta-particles - Part II: Tritium RBE and damage complexity. *Radiation environ. biophys.*, **40**, pp. 33-38.

Moses V., Calvin M. (1959), Photosynthesis studies with tritiated water. *Biochim. et Byophys. Acta*, **33**, pp. 297-312.

Murphy C. E. (1993), Tritium transport and cycling in the environment. *Health physics*, **65**, 6, pp. 683-697.

Nagasawa H., Little J. B. (1999), Unexpected sensitivity to the induction of mutations by very low doses of alpha-particles radiation: evidence for a bystander effect. *Radiation research*, **152**, pp. 552-557.

NCRP (1979). Tritium in the environment - Recommendations of the National Council on Radiation Protection and Measurements. NCRP, Washington.

Okada S., Momoshima N. (1993), Overview of tritium : characteristics, sources and problems. *Health physics*, **65**, pp. 595-609.

Okai T., Takashima Y. (1989), Analytical method for atmospheric tritium with a portable tritium sampling system. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, **130**, 2, pp. 399-407.

Osborne R. V. (1966), Absorption of tritiated water vapour by people. *Health physics*, **12**, pp. 1527-1537.

Osborne R. V. (1973). Sampling of tritiated water vapour. *3rd International Congress of the International Radiation Protection Association*, Washington, DC, pp.

Osborne R. V., Coveart A. S. (1977). A transportable monitor for tritiated water vapour. AECL.

Ota M., Yamazawa H., Moriizumi J., Iida T. (2007), Measurement and modelling of oxidation rate of hydrogen isotopic gases by soil. *Journal of Environmental Radioactivity*, **97**, 2-3, pp. 103-115.

Paganelli C. V., Solomon A. K. (1957), The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane. *The journal of General Physiology*, **41**, 2, pp. 259-277.

Patryl L., Guétat P. (2006). Modélisation des transferts du tritium à l'Environnement. CEA/DAM/DIF/DASE/SRCE/CCI.

Patton G. W., Cooper A. T. J., Tinker M. R. (1997), Ambient air sampling for tritium-determination of breakthrough volumes and collection efficiencies for silica gel adsorbent. *Health physics*, **72**, 3, pp. 397-407.

Pelletier G., Tremblay A. V., Hélie P. (1985), Facteurs influençant le profil métabolique des vaches laitières. *Can. Vet. J.*, **26**, pp. 306-311.

Persaud R., Zhou H., Hei T. K., Hal E. J. (2007), Demonstration of a radiation-induced bystander effect for low dose low LET  $\beta$ -particles. *Radiat. Environ. Biophys.*, **46**, pp. 395-400.

Person S., Bockrath R. (1964), Differential mutation production by the decay of incorporated tritium compounds in E. coli. *Biophysical journal*, **4**, 5, pp. 355-365.

Pinson E. A. (1951). The body absorption, distribution, and excretion of tritium in Man and Animals. USAEC, Los Alamos.

Pinson E. A., Anderson E. (1950). The absorption, distribution, and excretion of tritium in men and animals. United States Atomic Energy Commission, Oak Ridge, Tennessee.

Pinson E. A., Langham W. (1957), Physiology and toxicology of tritium in Man. *Journal of Applied Physiology*, **10**, 1, pp. 108-126.

Pinto M., Azzam E. I., Howell R. W. (2010), Investigation of adaptative responses in bystander cells in 3D cultures containing tritium-labeled and unlabeled normal human fibroblasts. *Radiation research*, **174**, 2, pp. 216-227.

Plastino W., Chereji I., Cuna S., Kaihola L., De Felice P., Lupsa N., Balas G., Mirel V., Berdea P., Baciuc C. (2007), Tritium in water electrolytic enrichment and liquid scintillation counting. *Radiation measurements*, **42**, pp. 68-73.

Pointurier F., Baglan N., Alanic A., Chiappini R. (2002), An improved method for the determination of low-level non-exchangeable organically bound tritium in biological samples. *Radioprotection*, **37**, pp. C1\_967-C1\_972.



Pointurier F., Baglan N., Alanic G. (2004), A method for the determination of low level organic bound tritium activities in the environmental samples. *Applied Radiation and Isotopes*, **61**, pp. 293-298.

Pointurier F., Baglan N., Alanic G., Chiappini R. (2003), Determination of organically bound tritium background level in biological samples from a wide area in the south-west of France. *Journal of environmental radioactivity*, **68**, pp. 171-189.

Potier de Courcy G., Frelut M. L., Fricker J., Martin A., Dupin H. (2003). Besoins nutritionnels et apports conseillés pour la satisfaction de ces besoins. In: Encyclopédie Médico-Chirurgicale. *médicales E. s. e. ed.*, Elsevier, Paris, vol. 10-308-A-10, pp. 32 p.

Priest N. D., Burchart P., Carlisle S. M. (2013), Retention and excretion of  $^3\text{H}$  in rats following the intratracheal intubation of tritiated pump oil. *Health physics*, **104**, 3, pp. 270-276.

Putnam D. F. (1971). Composition and concentrative properties of human urine. McDonnell Douglas Astronautics Company, Huntington Beach.

R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Raney F., Vaadia Y. (1965), Movement and distribution of THO in tissue water and vapor transpired by shoots of Helianthus and Nicotiana. *Plant Physiology*, **40**, pp. 383-388.

Raskob W. (1995). Assessment of the environmental impact from tritium releases under normal operation conditions and after accidents. *Fifth Tropical Meeting on Tritium Technology in Fission, Fusion and Isotopic Applications*, Belgirate, pp. 934-939.

Rayleigh L., Strutt J. W. (1902), On the distillation of binary mixtures. *Philosophical magazine*, **4**, 19-24, pp. 521-537.

Revina V. S., Voronin V. S., Lemberg V. K., Sukhodoev V. V. (1984), Comparative evaluation of the carcinogenic effects of chronic exposure to tritium oxide and external gamma-radiation. *Radiobiologiia*, **24**, 5, pp. 697-700.

Richard T. (2006). Etude infrarouge et isotopique de l'eau adsorbée et confinée, Université Paris-Sud XI, Paris, 198p.

Richardson R. B., Dunford D. W. (2003), A biochemical-based model for the dosimetry of dietary organically bound tritium-Part 2: Dosimetric evaluation. *Health physics*, **85**, pp. 539-552.

Richardson R. B., Dunford D. W., Peterson S.-R. (2001), Influence of gender differences in the Carbon pool on dose factors for intakes of tritium and  $^{14}\text{C}$ -labeled compounds. *Health physics*, **81**, 3, pp. 302-312.

Richmond C., Langham W., Trujillo T. (1962), Comparative metabolism of tritiated water by mammals. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **59**, pp. 45-53.

Risi C. (2009). Les isotopes stables de l'eau : applications à l'étude du cycle de l'eau et des variations du climat, Université Paris 6, Paris, 272p.

Rodriguez-Rodrigo L. (2008). La gestion des déchets d'ITER. *Colloque ANCCLI "Le tritium discret mais partout"*, Orsay, pp.

Rosson R., Jakiel R., Klima S., Kahn B., Fledderman P. (2000), Correcting tritium concentrations in water vapor monitored with silica gel. *Health physics*, **78**, 1, pp. 68-73.

Rudran K. (1988), Significance of in vivo organic binding of tritium following intake of tritiated water. *Radiation Protection Dosimetry*, **25**, pp. 5-13.

Rusinova G. G., Mushkacheva G. S., Turdakova V. A., Shorokhova V. B. (1989), Comparison of the biological effects of tritium oxide and gamma radiation based on changes in the mass of the rat thymus gland. *Radiobiologiya*, **29**, 6, pp. 798-803.

Russel W. L., B C. R., Kelly E. K., Phipps E. L. (1978). Induction of specific-locus mutations in the mouse by tritiated water. *The International Symposium on the Behaviour of Tritium in the Environment*, San Francisco, pp.

Saintigny Y., Roche S., Meynard D., Lopez B. S. (2008), Homologous recombination is involved in the repair response of mammalian cells to low dose of tritium. *Radiation research*, **170**, pp. 172-183.

Sakuma Y., Ogata Y., Tsuji N., Yamanishi H., Iida T. (2003), Removal of the impurities from environmental samples for tritium measurement by liquid scintillation counting. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, **255**, pp. 325-327.

Satow Y., Hori H., Lee J. Y. (1989a), Teratogenic effect of fission neutron and tritium water on rat embryo. *Journal of University of Occupational and Environmental Health*, **11**, pp. 416-431.

Satow Y., Hori H., Lee J. Y., Ohtaki M., Sawada S., Nakamura N., Okada S. (1989b), Effect of tritiated water on female germ cells: Mouse oocyte killing and RBE. *International Journal of Radiation biology*, **56**, 3, pp. 293-299.

Sauer P. E., Schimmelmänn A., Sessions A. L., Topalov K. (2009), Simplified batch equilibration for D/H determination of non-exchangeable hydrogen in solid organic material. *Rapid communications in mass spectrometry*, **23**, pp. 949-956.

Schimmelmänn A. (1991), Determination of the concentration and stable isotopic composition of nonexchangeable hydrogen in organic matter. *Analytical chemistry*, **63**, 21, pp. 2456-2459.

Seigneur C. (page mise à jour le 12/09/2013). Cours SGE "Modélisation de la pollution atmosphérique" Dispersion atmosphérique. [cerea.enpc.fr/fich/support\\_cours/SGE\\_M2\\_modelisation/SGE-Modelisation-Dispersion.pdf](http://cerea.enpc.fr/fich/support_cours/SGE_M2_modelisation/SGE-Modelisation-Dispersion.pdf).

Seyama T., Yamamoto O., Kinomura A., Yokoro K. (1991), Carcinogenic effects of tritiated water (HTO) in mice: in comparison to those of neutrons and gamma-rays. *Journal of Radiation Research*, **32 (suppl. 2)**, pp. 132-142.

Smith H. (1986), Transformation and conversion of tritium in mammals. *Radiation Protection Dosimetry*, **16**, pp. 135-136.

Snappe J.-J., Lepoudère A., Sredzinski N. (2010) Protéines laitières. In Techniques de l'Ingénieur, pp. F 4 820-1-F 4 820-19. Techniques de l'ingénieur, Paris.

Spector W. S. (1956). Handbook of Biological Data. W.B. Saunders, Philadelphiap.

Spencer F. S. (1984). Tritiated water uptake kinetics in tissue-free water and organically-bound fractions of tomato plants. Ontario hydro - research division.

Spoehr H. A., Milner H. W. (1949), The chemical composition of chlorella - Effect of environmental conditions. *Plant Physiology*, **24**, pp. 120-149.

Stan-Sion C., Enachescu M., Dogaru M. (2009). Environmental radionuclides measured by AMS. In: New Techniques for the Detection of Nuclear and Radioactive Agents. Aycik G. A. ed., Springer Science, pp.

Sternberg L., DeNiro M. J., Johnson H. B. (1984), Isotope ratios of cellulose from plants having different photosynthetic pathways. *Plant Physiology*, **74**, pp. 557-561.

Strack S., Diabaté S., Muller J., Raskob W. (1995), Organically bound tritium formation and translocation in crop plants. Modelling and experimental results. *Fusion technology*, **28**, pp. 951-956.

Straume T., Carsten A. (1993), Tritium radiobiology and relative biological effectiveness. *Health physics*, **65**, pp. 657-672.

Sweet C. W., Murphy C. E. (1981), Oxidation of molecular tritium by intact soil. *Environmental Science & Technology*, **15**, 12, pp. 1485-1487.

Takeda H. (1991), Incorporation and distribution of tritium in rats after chronic exposure to various tritiated compounds. *Int. J. Radiat. Biol.*, **59**, pp. 843-853.

Tanaka K., Sawada S., Kamada N. (1994), Relative biological effectiveness and dose rate effect of tritiated water on chromosomes in human lymphocytes and bone marrow cells. *Mutation research letters*, **323**, 1-2, pp. 53-61.

Tarancón A., Bagán H., Rauret G., García J. F. (2010), Comparative study of pre-treatment procedures for  $^3\text{H}$  monitoring in water samples from environmental protection programs. *Science of the Total Environment*, **408**, pp. 2233-2238.

Täschner M., Bunnenberg C. (1997), Measurement and modeling of tritium reemission rates after HTO depositions at sunrise and at sunset. *Journal of Environmental Radioactivity*, **36**, 2-3, pp. 219-235.

Täschner M., Bunnenberg C., Camus H., Belot Y. (1995), Investigations and modeling of tritium reemission from soil. *Fusion technology*, **28**, pp. 976-981.

Tauchi H., Ichimasa M., Ichimasa I., Shiraishi T., Morishima K., Matsuura S., Komatsu K. (2002), Studies of mutagenesis caused by low dose rate tritium radiation using a novel hyper-sensitive detection system. *Fusion science and technology*, **41**, pp. 413-416.

Taylor D. (2003), A biokinetic model for predicting the retention of  $^3\text{H}$  in the human body abfter intakes of tritiated water. *Radiation Protection Dosimetry*, **105**, 1-4, pp. 225-228.

Taylor D. (2008). Radiation doses from some [ $^3\text{H}$ ]-Labelled organig compounds following ingestion. *Radiation Protection Dosimetry*, Vol. **128**, pp. 299-308.

Teebor G. W., Frenkel K., Goldstein M. S. (1984), Ionizing radiation and tritium transmutation both cause formation of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine in cellular ADN. *Biochemistry*, **81**, pp. 318-321.

Teng Y., Zuo R., Wang J., Hu Q., Sun Q., Zeng N. (2011), Detection of tritium sorption on four soil materials. *Journal of Environmental Radioactivity*, **102**, 2, pp. 212-216.

Thompson P. A., Hamlat M. S., Lane R., Milhok S., Reinhardt P., Bundy K. (2011), Revue de l'état des connaissances des effets du tritium sur la santé et l'environnement au Canada - un outil pour orienter la surveillance réglementaire. *Radioprotection*, **46**, pp. 511-531.

Thompson R. C. (1952), Studies of metabolic turnover with tritium as a tracer - II. Gross studies on the rat. *J. Biol. Chem.*, **197**, pp.

Thompson R. C., Ballou J. E. (1954), Studies of Metabolic turnover with tritium as a tracer - IV. Metabolically inert lipid and protein fractions from the rat. *J. Biol. Chem.*, **208**, pp. 883-888.

Thompson R. G., Nelson C. D. (1971), Photosynthetic assimilation and translocation of  $^3\text{H}$ - and  $^{14}\text{C}$ -organic compounds after  $^3\text{HHO}$  and  $^{14}\text{CO}_2$  were simultaneously offered to a primary leaf of soybean. *Can. J. Bot.*, **49**, pp. 757-766.

Tisljar-Lentulis G., Henneberg P., Feinendegen L. E. (1983), The oxygen enhancement ration for single- and double-strand breaks induced by tritium incorporated in DNA of cultured human T1 cells. Impact of the transmutation effect. *Radiation research*, **94**, pp. 41-50.

Trivedi A. (1995), Percutaneous absorption of tritium-gas contaminated pump oil. *Health physics*, **69**, pp. 202-209.

Trivedi A., Cheng Y. S. (2000). Biokinetics and dosimetry of inhaled tritiated aerosols. *10th International Congress of the International Radiation Protection Association*, Hiroshima, Japan, pp.

Trivedi A., Galeriu D., Lamothe E. (2000), Dose contribution from metabolized organically bound tritium after chronic tritiated water intakes in humans. *Health physics*, **78**, pp. 2-7.

Trivedi A., Galeriu D., Richardson R. (1997), Dose contribution from metabolized organically bound tritium after acute tritiated water intakes in humans. *Health physics*, **73**, pp. 579-586.

Trivedi A., Richardson R. B., Galeriu D. (1995), Dynamics of tritiated water and organically bound tritium after an acute tritiated water intake in humans. *Fusion technology*, **28**, pp. 982-987.

Uda T., Sugiyama T., Tanaka M., Munakata K., Momoshima N. (2006), Developments of gaseous water, hydrogen and methane sampling for environmental tritium monitoring. *Fusion engineering and design*, **81**, pp. 1385-1390.

Ueno A. M., Furuno-Fukushi I., Matsudaira H. (1982), Induction of cell killing, micronuclei, and mutation to 6-Thioguanine resistance after exposure to low-dose-rate  $\gamma$  rays and tritiated water in cultured mammalian cells (L5178Y). *Radiation research*, **91**, 3, pp. 447-456.

UNSCEAR (1977). Sources and effects of ionizing radiation. (UNSCEAR, ed.). United Nations, New York.

UNSCEAR (2008). Sources and effects of ionizing radiation (Report to the General Assembly). Vol. 1. UN, New York.

Unterweger M. P., Coursey B. M., Schima F. J., Mann W. B. (1980), Preparation and calibration of the 1978 National Bureau Standards tritiated-water standards. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, **31**, 10, pp. 611-614.

Van den Hoek J. (1986), Tritium metabolism in animals. *Radiation Protection Dosimetry*, **16**, 1-2, pp. 117-121.

Van den Hoek J., Gerber G. B., Kirchmann R. (1980). Excretion of organic and inorganic tritiated compounds in cow's milk after ingestion of tritium oxyde. *In: Radiation protection. A systematic approach to safety: proceedings of the 5th Congress of the International Radiation Protection Society*. Pergamon press, Jerusalem, vol. 2, pp. 1068-1071.

Van den Hoek J., Ten Have M., G. G. (1983), The metabolism of tritium and water in the lactating dairy cow. *Health physics*, **44**, pp. 127-133.

Van den Hoek J., Ten Have M., Gerber G. B., Kirchmann R. (1985), The transfert of tritium-labeled organic material from grass into cow's milk. *Radiation research*, **103**, pp. 105-113.

Van Hook W. A. (1968), Vapor pressures of the isotopic waters and ices. *The journal of physical chemistry*, **72**, pp. 1234-1244.

Vichot L., Boyer C., Boissieux T., Losset Y., Pierrat D. (2008), Organically Bound Tritium (OBT) for various plants in the vicinity of a continuous atmospheric tritium release. *Journal of environmental radioactivity*, **99**, pp. 1636-1643.

Vulpis N. (1984), The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by in vitro irradiation with  $\beta$  particles from tritiated water. *Radiation research*, **97**, 3, pp. 511-518.

Weaver C. L., Harward E. D., H. T. Peterson J. (1969), Tritium in the environment from Nuclear Powerplants. *Public Health Reports*, **84**, 4, pp. 363-371.

Weinberger D., Porter J. W. (1953), Incorporation of tritium oxyde into growing *Chlorella pyrenoidosa* cells. *Sciences*, **117**, pp. 636-638.

Wierczinski B., Müllen G., Türler A. (2005), Tritium enrichment in the hydration sphere of humic substances. *Fusion science and technology*, **48**, pp. 783-786.

Wood M. J., McElroy R. G. C., Surette R. A., Brown R. M. (1993), Tritium sampling and measurement. *Health physics*, **65**, pp. 610-627.

Wood M. J., Workman W. J. G. (1991). Environmental monitoring of tritium in air with passive diffusion samplers. *4th. topical meeting on tritium technology in fission, fusion and isotopic applications*, Albuquerque, NM, pp.

Workman W. J. G., Kim S. B., Kotzer T. (2005), Interlaboratory comparison of organically bound tritium measurements in environmental samples. *Fusion technology*, **48**, 1, pp. 763-766.

Yamada Y., Itoh M., Egawa K., Kiriya N., Komura K., Ueno K. (1992), Effect of labile hydrogens on measurements of tritium preserved in hydrogens of cellulose. *J. Radioanal. Nucl. Chem., Letters*, **164**, pp. 47-57.

Yamada Y., Yukawa O., Asami K., Nakazawa T. (1982), Effect of chronic HTO  $\beta$  or  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  radiation on preimplantation mouse development in vitro. *Radiation research*, **92**, 2, pp. 359-369.

Yokoyama S., Noguchi H., Ichimasa Y., Ichimasa M. (2004), Re-emission of heavy water vapour from soil to the atmosphere. *Journal of Environmental Radioactivity*, **71**, pp. 201-213.

Zhou X. Y., Dong J. C., Geng X. S., Wei L. X. (1986), Tritium beta-rays and  $^{60}\text{Co}$  gamma-ray caused dominant lethal mutation in mice. *Chinese Medical Journal*, **99**, 5, pp. 420-423.

Zhou X. Y., Dong J. C., Zhou S. Y., Chen J. D., Guo F. R. (1989), Experimental study on relative biological effectiveness of tritium and risk estimates of genetic damage. *Chinese Medical Journal*, **102**, 11, pp. 872-878.







# Communications scientifiques

## Publications scientifiques

**Tritiation of milk in the vicinity of chronic tritium releases** (P. Le Goff, Ph. Guétat, L. Vichot, PM. Badot, F. Gaucheron et M. Fromm), rédaction en cours de finalisation

**Isotopic fractionation of tritium in biological systems** (P. Le Goff, M. Fromm, L. Vichot, PM. Badot, F. Gaucheron et Ph. Guétat), Environment International, 65 (2014), pp. 116-126

**Measurements of tritium in the free water of milk – Spotting and quantifying some biases and proposing ways of improvement** (P. Le Goff, JM. Duda, Ph. Guétat, P. Rambaud, Ch. Mavon, L. Vichot, PM. Badot et M. Fromm) – Journal of Environmental Radioactivity 127 (2014) pp. 1-10

**Apports de la surveillance du centre CEA-Valduc sur la connaissance des transferts de l'eau tritiée atmosphérique dans les différents compartiments de l'environnement** (Ph. Guétat, P. Le Goff, C. Boyer, JM. Duda), Radioprotection 48 (02) (2013), pp. 259-276

**Le tritium : de l'environnement à l'homme** (P. Le Goff, L. Vichot, Ph. Guétat, A. Bacchetta et N. Baglan), Chocs (sous presse)

## Communications orales et affichée

**Variability of Organically Bound Tritium in the vicinity of continuous atmospheric releases** (P. Le Goff, M. Fromm, Ph. Guétat et PM. Badot), poster, 10<sup>th</sup> International Conference on Tritium Science and Technology (2013) Nice (France)

**Tritium in a vicinity of a continuous atmospheric tritium release - From environment to Man** (P. Le Goff, Ph. Guétat et L. Vichot), communication orale, 1<sup>st</sup> Workshop on OBT (2012), Balaruc-les-Bains (France)

**Extraction de l'eau libre d'une matrice et mesures de l'activité tritium** (P. Le Goff, JM. Duda, Ph. Guétat et M. Fromm), communication orale, SFRP 2013 : Congrès de la Société Française de Radioprotection (2013), Bordeaux (France)

# Résumé

Le tritium est l'isotope radioactif de l'hydrogène. Il est capable d'intégrer la plupart des molécules biologiques. Bien que sa radiotoxicité soit faible, les effets du tritium seraient augmentés s'il était capable de se concentrer dans des compartiments critiques du vivant. Afin de mieux comprendre la circulation du tritium dans l'environnement et mettre en évidence les constantes de transfert entre compartiments, nous avons étudié la tritiation de différentes matrices agricoles exposées chroniquement à du tritium. La première étape de notre démarche est la validation des techniques mises en œuvre dans la préparation des échantillons. Nous avons démontré la possibilité de stocker des échantillons environnementaux à Valduc et avons mis en évidence différents biais liés à l'extraction de l'eau. Des solutions ont été proposées. Une hypothèse est formulée sur l'origine physique du facteur de séparation isotopique original que nous avons mis en évidence lors de l'extraction de l'eau du lait. Dans l'étude environnementale, les mesures faites sur les végétaux confirment l'importance de l'exposition atmosphérique dans la tritiation de la plante. L'absence de différence liée à l'espèce dans la tritiation de la matière sèche a été démontrée. La diversité des résultats obtenus sur la tritiation des différentes fractions de matrices végétales encouragent la poursuite de cette voie de recherche. Nous avons comparé la tritiation des principales fractions hydrogénées du lait, d'abord entre elles puis entre échantillons afin de mettre en évidence les facteurs à l'origine des différences observées. Nous avons ainsi montré la très grande corrélation entre l'eau d'abreuvement et l'eau libre du lait ainsi qu'entre les activités tritium de la matière sèche du bol alimentaire et des fractions organiques du lait. Nous avons également mis en évidence l'importance des paramètres métaboliques dans l'excrétion du tritium dans le lait. La synthèse de ces résultats montre l'importance des effets de la dilution de l'hydrogène dans les compartiments considérés devant les mécanismes de discrimination isotopique, y compris au sein d'une chaîne alimentaire exposée chroniquement dans son ensemble.

**Mots clés :** tritium, environnement, tritium organiquement lié, transfert, discrimination isotopique

# Abstract

Tritium is the radioactive isotope of hydrogen. It can be integrated in most of the biological molecules. Even if its radiotoxicity is weak, effects of tritium could be increased if it can concentrate in some critical compartments of beings. In order to better understand the tritium circulation in the environment and highlight constants of transfer between compartments, we have studied the tritiation of different agricultural matrices chronically exposed to tritium. The first step of our study is the validation of the different techniques used to prepare our sample. We have also demonstrated that it was possible to store environmental samples in the Valduc centre and have underlined some biases due to the extraction of free water. Some ways of improvements are proposed. A hypothesis has also been formulated on the origin of an original isotopic fractionation effect during the extraction of the free water of milk. In the environmental study, the specific activities measured on plants confirm the importance of the atmospheric exposure on their tritiation. No difference in the tritiation has been measured between wheat, barley and colza. Some differences have been measured in the tritiation of some organic components of vegetal matrices. These results underline the interest of continuing this kind of study. We have also compared the tritiation of the main hydrogenated components of milk, first, component to component, then, sample to sample. Some origins of the measured differences have been shown. We have demonstrated the correlation between the specific activities of drinking water and the free water of milk as between the tritiations of dry matter of cattle's food and of the main organic components of milk. Our results show also the importance of the metabolism on the distribution of tritium in the different compartments. The overall synthesis of our results show the importance of the dilution of hydrogen in the considered environmental compartments, above the isotopic effects, even in a food chain chronically exposed to tritium.

**Key words:** tritium, environment, organically bound tritium, transfer, isotopic fractionation